

Année 1952

N°

THESE

POUR LE

534

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'Etat)

P A R

THOUVENOT, Joseph, Paul, François, Marie.

Né le 16 Janvier 1926 à Mussy sur Seine (AUBE).

Présentée et soutenue publiquement le 19 Juin 1952

ETUDE CRITIQUE

DU

DOSAGE BIOLOGIQUE DE L'HISTAMINE

D'APRES UN ENSEMBLE DE RECHERCHES EXPERIMENTALES

PRESIDENT : Monsieur le Professeur René H A Z A R D

Année 1952

N°

THESE

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

P A R

THOUVENOT, Joseph, Paul, François, Marie.

Né le 16 Janvier 1926 à Mussy sur Seine (AUBE).

Présentée et soutenue publiquement le 19 Juin 1952

ETUDE CRITIQUE

DU

DOSAGE BIOLOGIQUE DE L'HISTAMINE

D'APRES UN ENSEMBLE DE RECHERCHES EXPERIMENTALES

PRESIDENT : Monsieur le Professeur René H A Z A R D

DOYEN HONORAIRE :

M. BAUDOUIN

Professeurs Honoraires :

MM. BAUDOUIN, BRINDEAU, CADENAT, CARNOT, CHABROL, CHEVASSU,
CHIRAY, CLERC, DELBET, GOUGEROT (H.), GUILLAIN, HARVIER, LAUBRY
LEMAÎTRE, LEMIERRE, LHERMITTE, LIAN, LOEPER, MARION, MATHIEU,
MOCQUOT, MULON, OLIVIER (E.) OMBREDANNE, SANNIE, SEZARY, TANON.

DOYEN : Léon BINET,
Membre de l'Institut

ASSESEUR : Jean VERNE

I.- PROFESSEURS :

	MM :
Anatomie	CORDIER (G.)
Anatomie Pathologique	DELARUE (A.)
Bactériologie	GASTINEL (P.)
Biologie appliquée à l'Education Physique et aux Sports	CHAILLEY-BERT(P)
Biologie Médicale	VERNE (J.)
Cancérologie médicale et sociale	HUGUENIN (R.)
Carcinologie	OBERLING (G.)
Chimie Médicale	N...
	BROCC (P.)
	de CAUDART
Cliniques Chirurgicales (	d'ALLAINES
(Hôtel-Dieu	MONDOR (H.)
(Broussais	QUENU (J.)
(Salpêtrière	
(Cochin	
Clinique Chirurgicale réparatrice et orthopédique	MERLE d'AUBIGNE
Clinique de cardiologie	DONZELOT (E.)
Clinique de Chirurgie infantile et d'or- thopédie	FEVRE (M.)
Clinique de Chirurgie pleuro-pulmonaire	MONOD (R.)
Clinique de la Tuberculose	BERNARD (E.)
Clinique de Neuro-Chirurgie	PETIT-DUTAILLIS(D)
Clinique de Puériculture	LELONG (M.)
Clinique des Maladies cutanées et Syphilit.	DEGOS (R.)
Clinique des Maladies du sang	CHEVALIER (P.)
Clinique des Maladies du Système Nerveux	ALAJOUANINE (T.)
Clinique des Maladies des Enfants	DEBRE (R.)

Clinique des Maladies Infectieuses		MOLLARET (P.)
Clinique des Maladies mentales et de l'encéphale		DELAY (J.)
Clinique gynécologique		FUNCK-BRENTANO (P.)
	Hôtel-Dieu	BENARD (H.)
	Bichat	LAROCHE (G.)
Cliniques Médicales	Cochin	MOREAU (R.)
	Broussais	de GENNES (L.)
Clinique Médicale d'Hydro-Climatologie thérapeut.	JUSTIN-BESANCON (L.)	
Clinique Médicale propédeutique	PASTEUR-VALLERY-RADOT (L.)	
Clinique Médico-Social du Diabète sucré		
et des Maladies de la Nutrition		BOULIN (R.)
	Tarnier	LANTUEJOUL (P.)
Cliniques Obstétricales	Baudelooquo	LEVY-SOLAL (E.)
	Port-Royal	LACOMME (M.)
Clinique ophtalmologique		VELTER (E.)
Clinique oto-rhino-laryngologique		AUBIN (A.)
Clinique Physio-pathologique des problèmes ali-		
mentaires (chaire à titre personnel)		RICHET (C.)
Clinique psychiatrique infantile		HEUYER (C.)
Clinique rhumatologique et sociale		COSTE (F.)
Clinique stomatologique		DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale		SENEQUE (J.)
Clinique urologique		FEY (B.)
Embryologie		GIROUD (A.)
Génétique		LAMY (M.)
Histoire de la Médecine et de la Chirurgie		MOUQUIN (M.)
Histologie		CHAMPY (C.)
Hygiène et Clinique de la première enfance		CATHALA (J.)
Hygiène et Médecine Préventive		JOANNON (C.)
Médecine du Travail		DESOILLE (H.)
Médecine Légale		PIEDELIEVRE (R.)
Parasitologie et Histoire Naturelle Médicale		GALLIARD (H.)
Pathologie Chirurgicale		MENEGAUX (G.)
Pathologie exotique		LAVIER (G.)
Pathologie expérimentale et comparée		LENEGRE (J.)
Pathologie humorale et immunologie expérimentale		MERKLEN (F.P.)
(chaire à titre personnel)		
Pathologie Médicale		BARIETY (M.)
Pathologie et Thérapeutique générales		GARCIN (J.)
Pédiatrie Sociale		MARIE (J.)
Pharmacologie et matière médicale		HAZARD (R.)
Physico-Chimie médicale (Chaire à titre personnel)		DOGNON (A.)
Physiologie		BINET (L.)
Physique Médicale		STROHL (A.)
Radiologie Médicale		DESGREZ (H.)
Technique Chirurgicale		MOULONQUET (P.)
Thérapeutique		TWRPIN (R.)



II.- PROFESSEURS SANS CHAIRE

MAITRES DE CONFERENCES - AGREGES ET AGREGES :

Anatomie	MM. DEBEYRE (J.) DELMAS (A.) Pr. s.Ch. N...
Anatomie Pathologique	GAUTHIER-VILLARS (Melle P.(Pr.s.Ch.) BUSSEY (F.) COUYGOU (C.) FASQUELLE (R.) NEVOT (A.) BOURLIERE (F.) ETTORI (J.) Pr.s.Ch. JAYLE (M.F.) Pr.s.Ch.
Bactériologie	SCHAPIRA (G.) DUPERRAT (F.) BULLIARD (H.) Pr.s.Ch.
Biologie Médicale	COUJARD (R.) N...
Chimie Médicale	DEBRAY (C.) BOYER (J.) DEPARIS (M.) DEROBERTE (L.) GAULTIER (M.) HADENGUE (A.) DAVID (M.) SEZE (S.de) GRASSET (J.) LEPAGE (F.) MAYER (M.) MERGER (R.) MORIN (P.) RAVINA (J.) VARANGOT (J.) OFFRET (G.) DESVIGNES (P.) JUDET (R.) HALPHEN (E.) Pr.s.Ch.
Dermato-Syphiligraphie	AUBRY (M.)
Histologie	
Hydrologie	
Hygiène	
Médecine légale et du travail	
Neurochirurgie	
Neurologie	
Obstétrique	
Ophtalmologie	
Orthopédie	
Oto-Rhino-Laryngologie	

Oto-rhino-laryngologie

MADURO (R.)

Parasitologie

BRUMPT (L.)

CHABAUD (A.)

Pathologie Chirurgicale

ABOULKER (P.)

BAUMANN (J.)

GOSSET (J.)

HUGUIER (J.)

LAURENCE (G.)

LEGER (L.)

LORTAT-JACOB (J.)

OLIVIER (Cl.)

PADOVANI (P.)

POILLEUX (M.)

ROUX (M.)

RUDLER (J.C.)

VERNE (J.M.)

N...

Pathologie Expérimentale

BERNARD (J.)

BOUDIN (G.)

CASTAIGNE (P.)

CONTE (M.)

DECOURT (J.)

DOMART (A.)

DREYFUS (Gilbert)

FAUVERT (R.)

HAMBURGER (J.)

KOURILSKY (R.)

LAMOTTE (M.)

LAROCHE (C.)

MILLIEZ (P.)

PEQUIGNOT (H.)

PERRAULT (M.)

RAMBERT (P.)

THIEFFRY (St.)

TURIAF (J.)

LAPLANE R.

JOSEPH (R.)

N ...

Pathologie Médicale

LEVY (Melle J.)

Pr.s.CH.)

CHEYMOL (J.H.)P.s.Ch.

BARGETON (D.)Pr.s.Ch.

PARROT (J.L.)

Pédiatrie

Pharmacologie

Physiologie

Physique Médicale

DJOURNO (A.)

Pr.s.Ch.

Pneumo-Phtisiologie

KREIS (B.)

Psychiatrie

BARUK (H.)

Psychiatrie infantile

MICHAUX (L.)

Stomatologie

CERNEA (P.)

CHAPUT (Mme A.)

Thérapeutique

PERRAULT

Chargé de

l'Enseignement

Urologie

KUSS (R.)

III.- PROFESSEURS HONORAIRES ET AGREGES RAPPELES A

L'EXERCICE :

pour le service des examens

MM. BRINDEAU (A.) (Obstétrique), GATELLIER (J.) (Clinique Chirurgicale), LE LORIER (V.) (Obstétrique), VAUDESCAL (R.)
Obstétrique

IV.- PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGREGES CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE (à titre permanent)

Clinique Chirurgicale

MM. AMELINE (A.)

PATEL (J.)

SICARD (A.)

Clinique Médicale

BROUET (G.)

CACHERA (R.)

HAGUENAU (M.) P.s.Ch.

MARCHAL (G.)

SOULIE (E.)

Clinique Obstétricale

ECALLE (G.)

Clinique ophtalmologique

RENARD (G.)

Clinique urologique

COUVELAIRE (R.)

Secrétaire Général de la Faculté

MOREL (J.)

Secrétaire

Melle CHAINTREUIL (G.)

Conservateur, chargé de la direction

Docteur HAHN (A.)

Conservateur

Melle GOICHON

Bibliothécaires Mlles DUMAITRE (P.), LE NOIR (G.), METIN (F.)
QUIEVREUX (E.)

Par délibération en date du 9 Décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR Léon B I N E T,
Doyen de la FACULTE DE MEDECINE DE PARIS,
Membre de l'Institut,
Membre de l'ACADEMIE DE MEDECINE,
Commandeur de la Légion d'Honneur,
Titulaire de la Chaire de Physiologie ,

Qui m'a fait le grand honneur de
m'admettre à travailler au
LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE DE
LA FACULTE,

EN HOMMAGE DE MA PROFONDE RECONNAISSANCE
ET DE MON PLUS GRAND RESPECT.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R e n é H A Z A R D

Titulaire de la Chaire de
PHARMACOLOGIE ,

Qui m'a fait le grand honneur
de présider mon Jury de Thèse,

EN HOMMAGE DE
RESPECTUEUSE RECONNAISSANCE

A MON CHER MAITRE,

Monsieur Jean-Louis P A R R O T

Professeur Agrégé

EN HOMMAGE A SA SCIENCE

ET A SES QUALITES HUMAINES

ERRATUM

Page 3 : Dernière ligne, lire "Secrétion gastrique histaminique"
(et non secrétine gastrique)

Page 7 : Ligne 4, lire : En portant en abscisses non les doses

Page 8 ter : Légende figure, lire : autre type de coordonnées
proposées :

$$(\text{Log} : \text{Log} \frac{x}{100 - x}) : x - x$$

Page 9 : Formule ligne 3

$$L(y) = \frac{1}{2} \frac{100}{\sqrt{2\pi}} \int_0^y e^{-\frac{1}{2} x^2} dx$$

Page 11 : Ligne 29

: abscisses

Page 14 : ligne 29 : ... (temps de latence à la demi-hauteur
de contraction $1 \text{ sec} \frac{1}{2}$ à 2 sec.) en forme
de pointe. 2

Page 19 : hors texte, Fig.6 :

Légende :

$$\text{Correction de } \frac{n}{100} = \frac{90}{100} : \Delta \text{ — } \Delta$$

Page 20 : Ligne 19 : 10 μg d'histamine

Page 22 : Ligne 5 : à la concentration de 2×10^{-6}

Page 32 : Ligne 28 (10 à 50 μg)

Page 33 : Ligne 14 ..., une faible e et une forte f.

Page 36 : Ligne 16, une dose de 0.25 μ g d'histamine

Page 44 : Ligne 18, Nota I oubliée :

Le bain de sable permet une ébullition plus régulière, mais doit être très bien surveillé pour éviter tout début de dessiccation.

I.- INTRODUCTION

A.- PROPRIETES DE L'HISTAMINE UTILISEES POUR LE DOSAGE :

Les tests utilisés :

- 1.- L'iléon isolé du Cobaye et autres tests à musculature lisse.
- 2.- La pression artérielle chez le Chat.

B.- IDENTIFICATION DE L'HISTAMINE; UTILISATION DES ANTIHISTAMINIQUES.

II.- LA REPONSE DE L'ILEON ISOLE DU COBAYE A L'HISTAMINE

Considérations physiologiques

Déductions pratiques

A.- MOYENS D'ETUDE.

- a.- Etude comparative des contractions simples sous l'influence de l'histamine ;
- b.- Recours au diagramme action-dose ;
- c.- Etude de la morphologie du tracé des contractions ; relation entre la dualité fonctionnelle exprimée sur certains diagrammes et l'enregistrement des contractions soutenues.

B.- LE DIAGRAMME ACTION-DOSE.

- a.- Généralités et fondements biologiques ;
- b.- Réalisation pratique du diagramme action - dose :
 - 1.- Les échelles utilisées pour la représentation graphique ;
 - 2.- Etablissement du diagramme ;
 - 3.- Détermination graphique des paramètres caractérisant la population supposée simple.

C.- COMPLEXITE DU DIAGRAMME ACTION-DOSE D'HISTAMINE, SUR L'ILEON ISOLE DU COBAYE.

- a.- Aperçu général.

b.- Etude et données numériques relatives aux diagrammes action-dose :

- 1.- Diagrammes simples
- 2.- Diagramme à incurvation haute rectifiable, en réalité simple,
- 3.- Diagrammes complexes ; analyse.

D.- QUELQUES PERSPECTIVES RELATIVES A L'ACTION DE L'HISTAMINE, SUR L'ILEON DU COBAYE.

- a.- Contraction histaminique et modification ionique du milieu ;
- b.- Contractions histaminiques et structures nerveuses.

III.- LE DOSAGE BIOLOGIQUE

A.- QUELQUES POINTS D'ORDRE TECHNIQUE :

- a.- Les animaux utilisés
- b.- Le test, le bain;
- c.- L'appareil d'enregistrement : le levier myographique, critiques, améliorations.

B.- PRATIQUE DES ESSAIS SUR L'INTESTIN ISOLE.

C.- RAPPEL DES METHODES CLASSIQUES DE DOSAGE :
LEUR CRITIQUE.

D.- TECHNIQUE DE L'ESSAI SUIVANT LA
METHODE PROPOSEE.

E.- DETERMINATION et INTERPRETATION DES RESULTATS.
DIVERS CAS.

F.- PREPARATION DE L'EXTRAIT :

- a.- Préparation de l'extrait suivant CODE, technique simplifiée ;
- b.- La technique de CODE est-elle valable ?
- c.- Dosage de l'histamine dans le sang.

IV.- CONCLUSIONS

V.- BIBLIOGRAPHIE

I-INTRODUCTION

L'étude du diagramme action-dose ayant révélé la nature complexe de l'action qu'exerce l'histamine sur l'iléon du Cobaye (J.L. PARROT, 1950), il apparaissait intéressant d'envisager à la suite de ce travail et des recherches qui l'ont suivi (J.L. PARROT et J. THOUVENOT) les conséquences que les faits apportés pourraient avoir du point de vue de la critique du dosage biologique de l'histamine.

L'analyse du diagramme fournit, en effet, un moyen qui permet la critique expérimentale des essais sur le test iléon du Cobaye ainsi qu'une méthode pratique de détermination de l'activité des extraits à doser, grâce à l'analyse graphique des éléments apportés par le diagramme.

Cette méthode semble présenter certains avantages sur les méthodes classiques, en particulier : la possibilité d'évaluer la précision de l'essai dans des conditions qui restent simples tant dans la mise en oeuvre du dosage que dans l'évaluation des résultats, ce qui présente un intérêt pour les dosages d'histamine dans le sang des malades.

A.- PROPRIETE DE L'HISTAMINE

UTILISEES POUR LE DOSAGE

Les tests utilisés

I.- L'ILEON ISOLE DU COBAYE :

Parmi les grandes propriétés pharmacodynamiques de l'histamine connues depuis DALE et LAIDLAW (1910), deux sont utilisées pour le dosage de cette substance : l'histamine contracte la plupart des fibres lisses et on connaît depuis longtemps (GUGGENHEIM et LOEFFLER, 1912) la haute sensibilité de l'iléon terminal du Cobaye à l'histamine.

Celui-ci sert le plus souvent de test par les contractions qu'il produit sous l'influence de celle-ci. D'autres organes à musculature lisse ont été utilisés : le cœcum

rectal du oulet (BARSOU et GADDUM, 1935) est cependant moins fidèle dans ses réponses ; l'utérus de Cobaye ne présenterait guère d'intérêt, le tonus en dehors de toute contraction n'étant pas stable.

2.- LA PRESSION ARTERIELLE CHEZ LE CHAT :

L'histamine provoque chez les espèces carnivores une hypotension résultant de l'antagonisme bien connu entre la constriction des artères et la dilatation des capillaires. On peut utiliser l'enregistrement de la pression artérielle chez un chat soumis à l'atropine pour éliminer l'action sur le test de l'acétylcholine et d'autres substances de même action et la soustraire à des réflexes parasympathiques. C'est, en somme, la même préparation qui est utilisée pour le dosage de l'adrénaline, à cette différence près que la réponse produite par l'histamine est une hypotension, dont la mesure permet le dosage lorsque l'histamine est présente en assez grande quantité, car ce test est relativement peu sensible et peu spécifique. L'intérêt qu'a pu présenter cette méthode, que nous citons pour mémoire, a été de permettre la comparaison de l'activité d'extraits sur différents tests, afin d'identifier l'histamine à côté d'autres substances, très différentes, mais qui produiraient sur un seul test une action qui, à première vue, pourrait ressembler à celle qu'exerce l'histamine.

B.- IDENTIFICATION DE L'HISTAMINE

Utilisation des antihistaminiques

Les procédés d'extraction proposés pour doser l'histamine, telle l'extraction par ébullition en milieu acide (BARSOU et GADDUM, 1935 ; GODE, 1937) permettent déjà d'éliminer un grand nombre de substances, actives sur les muscles lisses, tels le "Spätgift" et "l'adénosine". En outre, d'autres substances, tels la choline et ses dérivés, ainsi que la substance décrite par PARROT et RICHET (1943), sont inactivées par l'atropine ($0,5 \times 10^{-7}$). Cependant, il existe des substances ou leur produit de dégradation, des ions mêmes, tels que le potassium, peuvent agir sur les divers tests après extraction. Citons, par exemple, la substance que LANGE et FELIX et leurs Collaborateurs ont décrite et qu'on rencontre dans les extraits de sang et de certains tissus.

BARSOU et GADDUM avaient déjà indiqué, comme caractère de l'histamine, que l'intestin-test devenait moins sensible à cette substance immédiatement après la contraction qu'elle venait de provoquer, fait déjà signalé par FELDBERG et SCHILF (1930). Or, cette

inhibition résiduelle, fait sur lequel nous reviendrons, est particulièrement nette avec l'histamine mais peut aussi s'observer pour d'autres substances telles que : l'acétylcholine, la pilocarpine, la nicotine, etc.,... , excepté pour le potassium (CANTON et EASTMANN, 1946). Dans certains travaux, il est nécessaire de comparer l'action d'un extrait sur plusieurs tests. On sait que le muscle isolé de grenouille (rectus, par exemple) est insensible à l'histamine, mais assez sensible au potassium. Si on utilise simultanément plusieurs tests sensibles à l'histamine : iléon de Cobaye, pression artérielle du chat atropinisé, les réponses obtenues doivent être affectées parallèlement.

Une autre méthode générale destinée à faire la preuve que l'activité d'un extrait est bien due à une substance consiste à vérifier son inactivation spécifique. Or, l'histaminase est d'un emploi malaisé, car il n'en existe pas encore de préparation pure.

L'avènement des antihistaminiques a fait perdre beaucoup de l'intérêt à ces épreuves combinées sur plusieurs tests (pression artérielle du Chat et iléon de Cobaye. Il est maintenant plus commode d'effectuer sur l'iléon de Cobaye la contre-épreuve qui consiste, en présence d'un extrait actif, à le soumettre à l'action d'un antihistaminique (essais qu'on pratiquera simultanément sur un 2^e fragment d'iléon). Seule, l'action réellement due à l'histamine est antégonisée spécifiquement par les antihistaminiques. La découverte de cet antagonisme pharmacologique a pour origine un travail de UNGAR, PARROT et BOVET, effectué dès 1937 dans le laboratoire de J. TINEL.

Pour la première fois, il était établi qu'un corps de synthèse inhibait l'activité de l'histamine. Il s'agissait du 933 F et le test était l'intestin isolé du Cobaye.

L'inhibition, réversible et spécifique, se manifestait dès la concentration d'un dix-millionième. Ce fait nouveau va permettre, dans les conditions de l'expérimentation sur l'animal, d'attribuer à l'histamine telle ou telle activité biologique ; la même année, G. UNGAR et J.L. PARROT utilisent pour la première fois cette méthode générale pour identifier la substance qui se trouve libérée des organes par le choc anaphylactique. Pareillement, D. BOVET poursuivait ses admirables recherches ; et, en 1942, devait apparaître le premier antihistaminique commercialisé. Sa synthèse était due à MOSNIER et son étude pharmacologique à HALPERN.

Remarquons, en outre, que certaines actions de l'histamine pourraient bien rester insensibles à l'action des antihistaminiques comme c'est le cas de la sécrétine gastrique histaminique.

II.- LA RÉPONSE DE L'ILÉON ISOLÉ DU COBAYE A L'HISTAMINE. -CONSIDÉRATIONS PHYSIOLOGIQUES - DEDUCTIONS PRATIQUES-

A.- MOYENS D'ETUDES

L'action qu'exerce l'histamine sur l'iléon isolé du Cobaye a été l'objet de nombreux travaux. Citons, notamment, ceux de FELDBERG, ROCHA E SILVA, AMBACHE, ZADINA, PARROT, etc... Cependant, le mécanisme même de la contraction histaminique n'est pas encore entièrement élucidé. Trois procédés permettent d'étudier cette action dans les conditions d'organes isolés, qui sont voisines de celles du dosage.

a.- ETUDE COMPARATIVE DES CONTRACTIONS SIMPLES SOUS L'INFLUENCE DE L'HISTAMINE.

Dans la technique des essais biologiques effectués sur l'intestin par la plupart des auteurs, les substances capables de provoquer une réponse ne sont maintenues que pendant peu de temps dans le bain : le temps juste nécessaire pour obtenir le sommet de la contraction qui se traduit par une encoche sur le tracé, et, sitôt cet effet obtenu, la substance est évacuée et l'organe est soumis à des lavages. Seules, les substances modificatrices qui n'ont pas d'effet propre (cocaine, hexaméthonium, etc...) sont introduites dans le liquide de Tyrode utilisé pour l'expérience pendant le temps voulu. Or, nous avons observé qu'il est possible d'obtenir, avec l'histamine, des contractions soutenues en présence de glucose ($1/2 \text{ IO}^{-3}$ à IO^{-3}).

L'expérience a montré qu'avec un nombre de lavages suffisant, la sensibilité de l'organe n'est nullement réduite après cette contraction soutenue. Cette contraction offre dans ces conditions et avec une assez grande fréquence, un aspect complexe à deux sommets et, pour des raisons que nous étudierons plus loin, on peut penser qu'il s'agit là d'une véritable dualité.

b.- LE DIAGRAMME ACTION-DOSE.

On considérait jusqu'à ces dernières années, que le diagramme action-dose était d'un type très simple se présentant en coordonnées semi-logarithmiques sous forme d'une courbe en S, analogue aux courbes que A.J. CLARK (1933) avait décrites pour représenter l'action de l'acétylcholine sur le ventricule de Grenouille. Ces diagrammes en S, bien connus depuis TREVAN (1938) sont l'expres-

sion d'un phénomène très général résultant de la mise en jeu d'unités quantiques, indépendantes les unes des autres et normalement distribuées.

Ces diagrammes simples peuvent aisément être représentés en utilisant les échelles logarithmes-probabilités.

C.- ETUDE DE LA MORPHOLOGIE DU TRACE DES CONTRACTIONS ; RELATIONS ENTRE LA DUALITE FONCTIONNELLE EXPRIMEE SUR LE DIAGRAMME ET L'ENREGISTREMENT DES CONTRACT.SOUTENUES (J.L.PARROT et J.THOUVENOT (1952)

Nous verrons que les aspects complexes présentés par le diagramme sont, en effet, en relation avec la dualité de chaque contraction soutenue. Une analyse combinée entre la morphologie des contractions et le diagramme pourrait ainsi constituer un moyen d'étude de cette dualité.

Cette étude ne manquera pas de faire apparaître des modifications qui se manifesteront d'une manière différente pour chaque composant, c'est déjà ce qui ressort d'expériences en cours avec des substances dites VERATRINIQUES (VERATRINE et SULFOCYANURE de SODIUM). Cette disjonction des caractéristiques pharmacologiques fournirait ainsi une preuve supplémentaire en faveur de l'existence d'un double mécanisme qui peut se traduire directement par les deux sommets que dessine le tracé des contractions soutenues.

B.- LE DIAGRAMME ACTION-DOSE

a.- GENERALITES ET FONDEMENTS BIOLOGIQUES.

C'est la base même sur laquelle repose la critique du dosage biologique de l'histamine relative au test. Nous avons déjà dit que le diagramme avait été considéré comme de nature simple dans de précédents travaux et, notamment, ceux de BONSIGNORE et MORANDO, ZADINA, CHEN, ENSORE et CLARKE, etc... Voyons ici à quelles interprétations peuvent nous conduire un diagramme simple et un diagramme complexe comme ceux que nous obtenons.

Si nous cherchons à étudier comment varie la grandeur d'une action mesurable comme une contraction musculaire en fonction de la dose, on aborde là un problème général de pharmacologie : l'effet est-il susceptible de variations continues, comme le serait la croissance d'un organe ou d'un organisme ? On constate alors que la réponse (poids de l'organe ou dimension quelconque) en fonction de la dose (exprimée par son échelle arithmétique) est représentée par une courbe de la forme

$Y = \log. X + C$ (C représentant une constante). On pourrait citer comme exemple l'action de l'hormone hypophysaire de croissance ou la croissance de la crête d'un chapon soumis à des doses croissantes de testostérone, etc.. (1). En portant en abscisses non les doses elles-mêmes, mais leurs logarithmes, et en ordonnées la croissance de l'organe étudié, le diagramme est alors représenté par une droite. Cependant, quel que soit le type d'action : croissance, mortalité, réponse d'un organe musculaire, un diagramme (2) représenté dans ce même système de coordonnées semi-logarithmiques n'aboutit plus à une droite mais à une courbe en forme de " S ". Quelle est alors, dans ce dernier cas, la signification physiologique du phénomène ainsi représenté et comment légitimer cette représentation ? - Nous savons qu'une telle courbe en S, dite ogive de GALTON (3), représente la sommation de réponses quantiques (réponses tout ou rien) données par des unités biologiques indépendantes les unes des autres et normalement distribuées, c'est-à-dire dont l'ensemble constitue une population homogène et symétrique et dont les unités sont suffisamment nombreuses pour être comparées à la loi normale de LAPLACE (4).

Bien entendu, cette population ne présente son aspect symétrique que si l'on porte en abscisses non les doses elles-mêmes, mais leurs logarithmes, sinon, la population serait, au contraire, fortement asymétrique. Il s'agit là d'une distribution logarithmico-normale. Dans la suite, nous représenterons toujours en abscisses non les doses elles-mêmes, mais une grandeur proportionnelle à leur logarithme et, dans ces conditions, on peut considérer la distribution comme symétrique (fig. I).

Un muscle comme le muscle longitudinal de l'iléon du cobaye, serait donc composé d'unités biologiques contractiles dont chacune obéirait à la loi du tout ou rien. Cette loi qui sem-

-
- (1) On trouvera de nombreux exemples dans l'excellent ouvrage de J.H. BURN D.J. FINNEY et L.G. GOODWIN "Biological standardization", Oxford U. Press. London 1950.
 - (2) Beaucoup de diagrammes établis avec peu de points pourraient grossièrement exprimer l'action en fonction de la dose du log. alors que vers les faibles doses et les fortes doses un plus grand nombre de points donnerait à ce diagramme une allure de courbe en S dont la partie médiane pourrait être à première vue représentée par une droite.
 - (3) D'où le nom de diagramme en ogive donné par Schackell (1935). La courbe dite ogive de Galton ne ressemble guère à la figure connue en architecture.
 - (4) Appelé à tort loi de Gauss.

ble régir toute action biologique au stade unitaire, semblait ne pas pouvoir s'appliquer au muscle lisse où l'existence d'un système nerveux autonome et la structure histologique semblaient rendre les unités contractiles dépendantes les unes des autres. Des travaux comme ceux de BOZLER (1927, 1936), de FLETCHER (1937) ont montré que la loi du tout ou rien peut être appliquée au muscle lisse. On pourrait penser que ces unités contractiles sont les fibres musculaires elles-mêmes. Or, il semble plutôt s'agir d'unités comprenant déjà un certain nombre de fibres liées physiologiquement entre elles. C'est ce qui pourrait résulter d'un travail récent où l'analyse de la variance des données fournies par les réponses de l'intestin de Cobaye à un dérivé de la saligénine, semblerait indiquer que le nombre d'unités fonctionnelles effectivement mises en jeu pour une contraction de un millimètre pourrait être évalué à une centaine en moyenne (M. BERTRAND, Th. GAYET-HALLION et D. QUIVY, 1951). Il ne peut s'agir de fibres lisses infiniment plus nombreuses, mais de groupements fonctionnels qui obéiraient à la loi du tout ou rien. La nature de ces groupements reste assez hypothétique mais, de toute manière, le nombre de ces unités réactionnelles est assez élevé pour être assimilé à une distribution binomiale. En partant du diagramme qui représente, analytiquement, les fréquences cumulées, on peut retrouver le diagramme des fréquences elles-mêmes, qui en est l'expression dérivée (fig. 1). Ceci signifie que, pour un accroissement de la variable $\log. x$, x représentant la dose ($\log. x$ étant aussi petit que l'on veut), une fraction nouvelle de la population entrera en jeu, fraction qui est représentée par l'ordonnée y' de la courbe " en cloche " située en bas de la figure 1. (La zone médiane de la courbe correspondant aux fréquences maxima, ceci signifie que la plupart des unités réagissent à la dose moyenne). Ce point de la courbe permet ainsi de définir la dose moyenne, et la dispersion autour du logarithme de la dose moyenne sera mesurée par l'écart-type s et nous verrons comment le déterminer. Toute population normalement distribuée est entièrement déterminée par la connaissance de la moyenne et son écart-type. Ces paramètres mesurent la sensibilité moyenne à l'histamine (fig. 1). Pour une autre substance, on aurait un diagramme différent. On pourrait considérer ainsi une même population, mais sensible à plusieurs substances ou plusieurs mécanismes. Les diagrammes pourraient être caractéristiques de la substance pour une population donnée, et on peut concevoir que l'action simultanée de deux substances ou deux mécanismes différents peut conduire à des diagrammes plus complexes, c'est ce que nous envisageons plus loin.

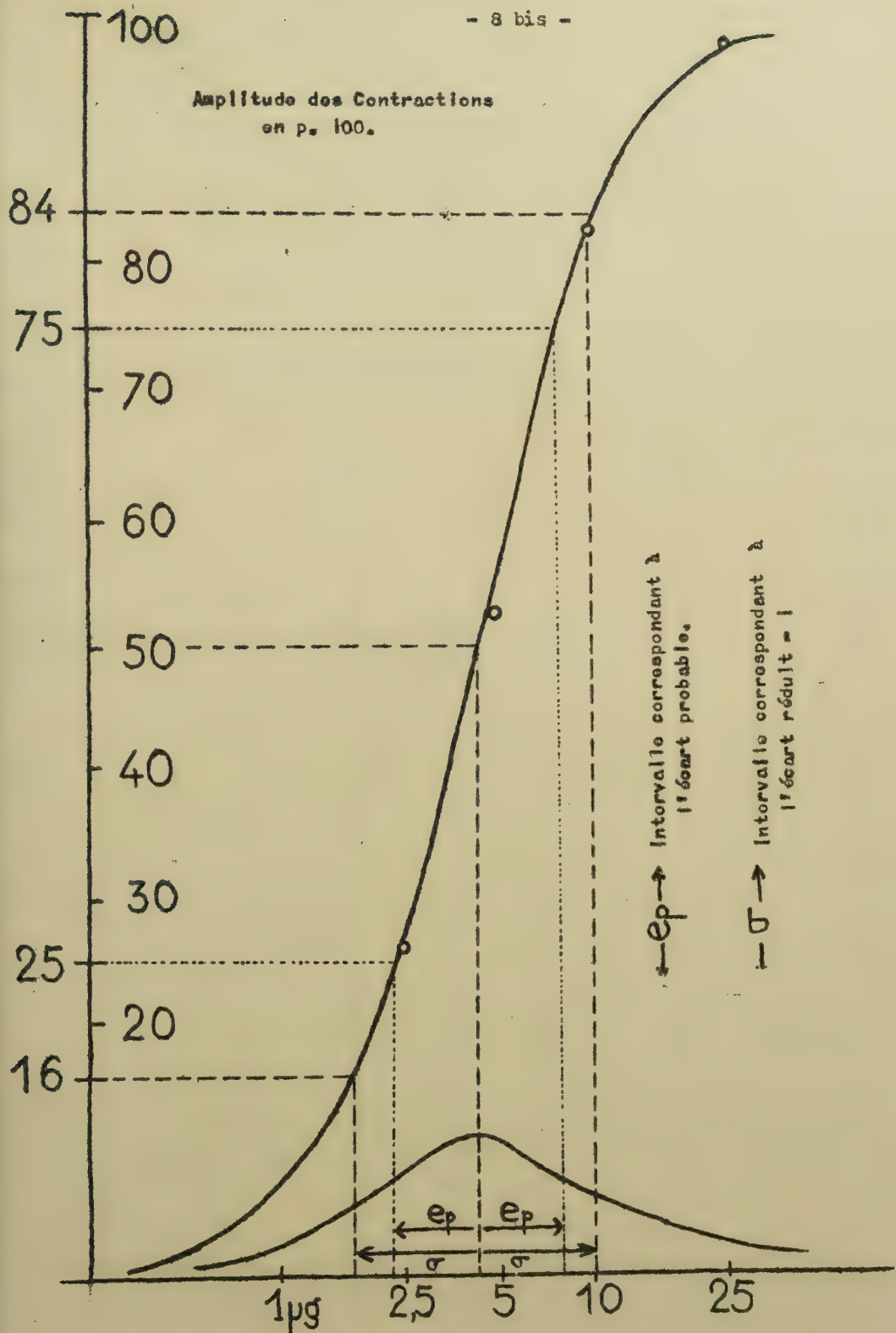


Figure 1 A

Histamine dichl²
sur échelle logarithmique.

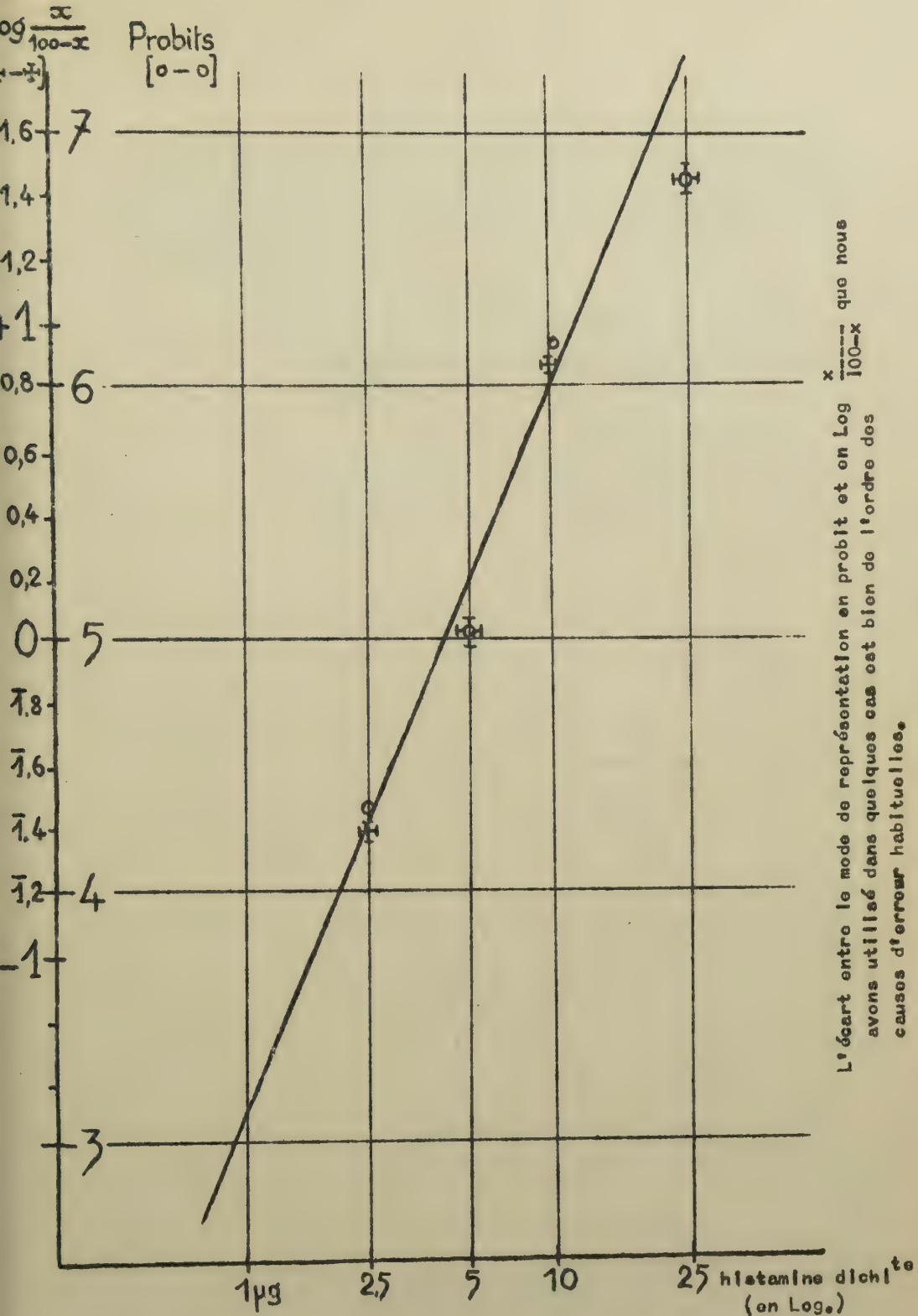


Figure 1 B

Même diagramme que la Figure 1 A mais représenté en coordonnées
 logarithme-probabilité (Log; probit) (○—○ et en un autre
 type de coordonnées proposées (Log; Log) ($\frac{x}{100-x}$) (†—†)
 où x est l'amplitude relative de la réponse évaluée en p. 100
 de l'amplitude maximale.

La contraction musculaire résulte de la totalisation de toutes les fibres actuellement en jeu, les nouvelles fibres entrées en jeu ajoutant leur effet à celles qui sont déjà en contraction ; c'est bien ce qu'exprime le diagramme des fréquences cumulées, qui n'est autre que le diagramme en ogive d'où nous étions parti.

b.- REALISATION PRATIQUE DU DIAGRAMME ACTION-DOSE.

I.- Les échelles utilisées pour la représentation graphique.

- Le système d'ordonnées probabilité et d'abscisses logarithmiques permet, dans le cas des diagrammes simples, l'alignement des points. Les diagrammes ainsi représentés par une droite sont les plus nombreux (voir fig. 2. ainsi que le travail de CHEN, ENSORE et CLARKE, 1948).

α Les échelles de probabilité : Elles sont basées sur les propriétés de la loi normale ; très utilisées dans de nombreux domaines depuis HENRY (1894). Leur ordonnée, en vraie grandeur, est choisie proportionnelle à une certaine grandeur Y , dite écart réduit qui mesure l'écart à la moyenne μ relativement à l'écart-type σ qui caractérise la population de LAPLACE, qui est choisie comme référence. Cette grandeur :

$$Y = \frac{y - \mu}{\sigma}$$

représente la variable réduite qui, sous cette notation, peut être représentée dans l'intégrale de LAPLACE et qui définit d'une manière générale la fraction $L(Y)$ de la population totale exprimée en pour cent :

$$L(Y) = \frac{1}{2} \frac{100}{\sqrt{2\pi}} \int_{\sigma}^Y e^{-\frac{1}{2} Y^2} dY$$

Dans ces échelles, si Y est l'ordonnée, la représentation du phénomène obéissant à la loi normale est exprimée par une droite :

$$Y = a + bx.$$

Echelle probabilité graduée directement en pour cent : Il est très commode de pouvoir construire le diagramme sans recours à des calculs ou à des tables. Ce type d'échelle permet l'évaluation directe de l'écart des points à

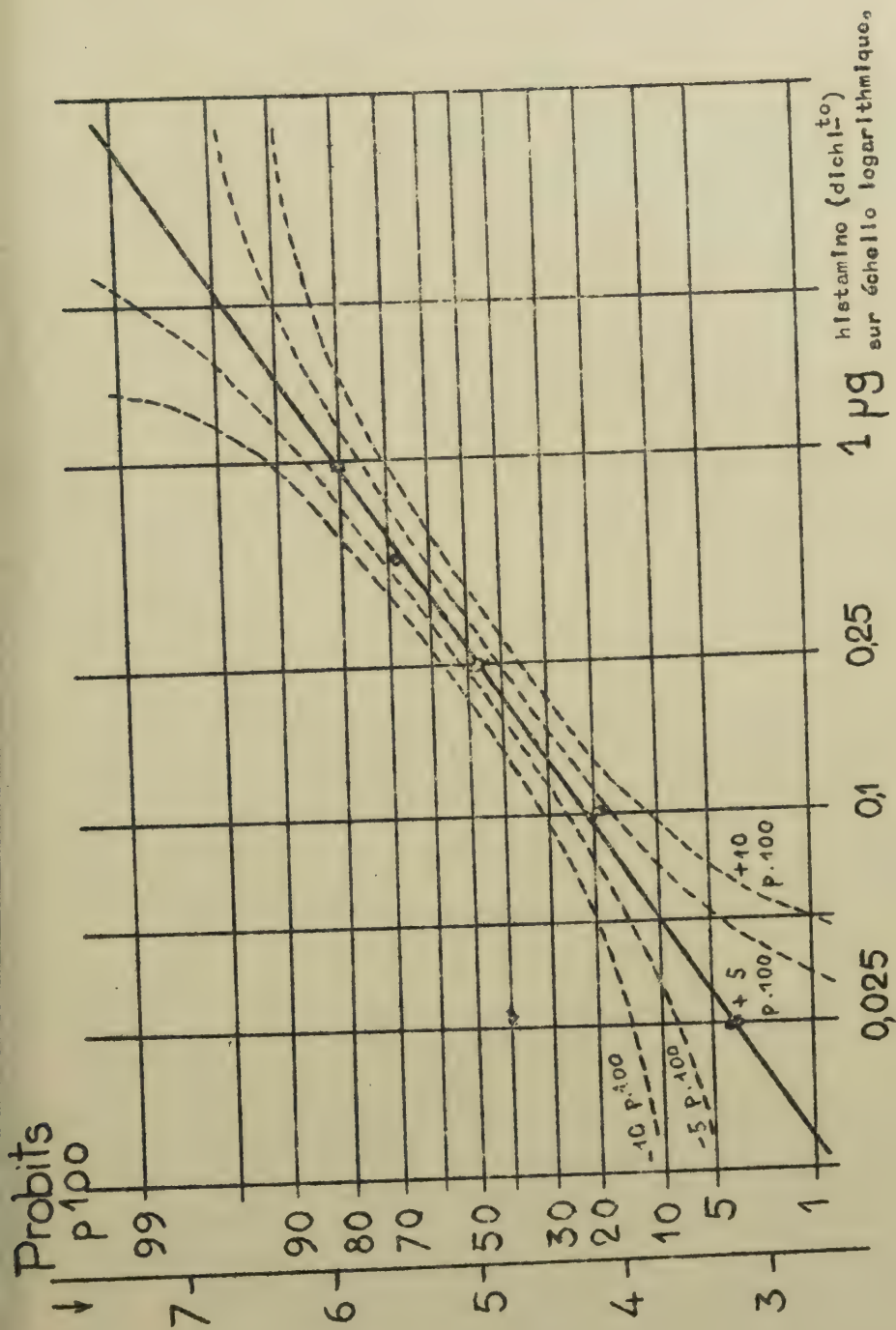


Figure 2: Diagramme simple d'après une de nos expériences.
Limites de dispersion à 5 p. 100 et 10 p. 100
autour de la droite.

la droite représentative du diagramme. On peut utiliser le papier logarithme-probabilité d'après P. BONET-MAURY (1). Voici comment peut s'établir une telle échelle : on choisit comme ordonnée une unité de longueur proportionnelle à l'écart réduit ; ainsi, sur le papier d'après P. BONET-MAURY, l'intervalle correspondant à 1 (écart réduit) est 20 mm. Pour indiquer les valeurs correspondantes de la population exprimée en pour cent, on fait correspondre à $Y_0 = 0$ la valeur 50 pour cent. On sait, grâce à des tables de la fonction de LAPLACE (2), que 68 pour cent de la population totale sont groupés autour de la moyenne, en deçà des limites ± 1 ; cela signifie que 68/2 pour cent sont situés au-dessus et 68/2 au-dessous de la ligne d'origine. Ces valeurs, qu'on peut faire correspondre à des ordonnées + 1 et - 1, seront respectivement : $50 + 68/2 = 84$ p. 100 et $50 - 68/2 = 16$ p. 100 au-dessous de l'origine 0 correspondant à 50 p. 100.

De même, aux ordonnées - 2 et + 2, correspondront les valeurs : $50 - \frac{96}{2} = 2$ p. 100 et $50 + \frac{92}{2} = 98$ p. 100, etc...

Recours aux probability-units ou " probits " : Connaissant la valeur représentant la contraction exprimée en pour 100, on peut connaître quelle est l'ordonnée Y par le moyen de tables (3). L'unité Probit, introduite par BLISS, n'est autre que l'écart réduit Y déjà utilisé par GADDUM (1933) dont l'ordonnée a été décalée de + 5 afin d'éviter les valeurs négatives ; ainsi, la droite représentative en probit sera :

$$Y = \frac{x - \mu}{\sigma} + 5 = a + bx$$

La valeur 50 p. 100 correspondra à probit 5, les valeurs 16 et 84 correspondront à probit 4 et 6.

β Echelle logarithmique des abscisses : Elle n'a rien de particulier, il y a lieu, cependant, d'exprimer les abscisses en vraie grandeur par le logarithme de la dose + 3 afin d'éviter les valeurs négatives : le chiffre 3 a été choisi car, pour l'histamine, le seuil d'action est de l'ordre de 10^{-9} dans nos expériences (fig. 2).

-
- (1) En dépôt chez Jouan, Paris. On peut utiliser le papier logarithme-probabilité à plus grande échelle, qu'on peut se procurer à la compagnie Française des diagrammes, 24 rue d'Inkermann, Neuilly-sur-Seine.
 - (2) Voir statistical Tables de Fisher et Yates, Olivier and Boyd, L. Y. D. Edinburgh.
 - (3) Tables de Fisher et Yates, Olivier and Boyd, L. Y. D. Edinburgh Statistical.

Par exemple, la dose de 0,005 μg correspond à $\log. \text{dose} + 3 = 0,7$; $\log. \text{dose } 0,1 \mu\text{g} + 3 = 2$, etc...

2°- Etablissement du diagramme.

La hauteur de chaque contraction exprimée en pour cent de la contraction maximale est portée dans le système de coordonnées logarithme-probabilité. On commence par réaliser la représentation graphique qui suffit dans bien des cas ; le plus souvent, les points s'alignent assez bien et il est facile d'ajuster une droite moyenne en tenant compte du point fondamental suivant : l'intervalle représentant la dispersion des points dépend de l'ordonnée ; autrement dit, le poids de la valeur de chaque réponse dépend de la fréquence exprimée par la loi normale prise pour référence : c'est, en effet, la conséquence de cette échelle de probabilité. Pour exprimer graphiquement ces notions, nous avons représenté, pour une de nos expériences, les limites des écarts correspondant à 5 et à 10 pour cent de part et d'autre de la droite moyenne qui correspond à un de nos diagrammes simples (fig. 2, dessinant ainsi une famille d'hyperboles.

Puisque l'importance accordée à chaque point n'est pas la même suivant l'ordonnée de ce point, le calcul d'une droite de régression, après avoir converti la hauteur de chaque contraction en probit, n'a guère de sens. En effet, le calcul classique de droite de régression attribue à chaque point le même poids. Il faut alors calculer la droite de régression pondérée qui est obtenue en prenant soin d'affecter la valeur de chaque point de son poids w qu'exprime le coefficient de " pondération " qu'on trouvera dans les tables et qui permet de passer aux probits de travail. Aux termes $\sum (x - \bar{x})^2$ et $\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})$ du calcul classique, font place les termes $\sum w(x - \bar{x})^2$ et $\sum w(x - \bar{x})(y - \bar{y})$. Pour le détail du calcul, nous renvoyons aux ouvrages de Finney déjà cités.

3°- Détermination des caractéristiques de la population supposée simple.

En possession de la droite représentative (le diagramme étant supposé simple), la pente est d'autant plus grande que Σ est plus petit, autrement dit, on a :

$$a = \frac{K}{\sigma}$$

K dépend des échelles utilisées. Ainsi, dans l'échelle

d'après P. BONET-MAURY, $K = 1/2,5$. Si nous choisissons une échelle logarithme-probabilité où l'intervalle entre le logarithme d'une dose et celui d'une dose $d \times 10$ est égal, sur le papier, à l'intervalle d'une unité probit, dans ces conditions, la pente représente l'inverse de la dispersion σ . L'abscisse correspondant à 50 p. 100 ou probit 5 donne la moyenne exprimée en $\log.dose + 3$, et les abscisses qui correspondent aux ordonnées probit 4 et 6 représentant à 16 et à 84 pour cent de l'action maximale, permettent d'obtenir l'écart-type σ (exprimé également en $\log.dose + 3$) qui définit la répartition des unités réactionnelles qui constituent la population considérée.

C.- COMPLEXITE DU DIAGRAMME ACTION-DOSE D'HISTAMINE SUR L'ILEON ISOLE DU COBAYE

a.- APERCU GENERAL.

Dans le précédent chapitre, nous n'avions considéré que des diagrammes simples où il n'existe qu'une seule population d'effecteurs. Or, l'étude systématique des diagrammes action-dose a montré que dans 1/3 des cas, le diagramme ne peut être entièrement représenté par une droite ; en effet, au segment de droite initial que nous avons appelé α pour les faibles doses fait suite, à partir d'une certaine dose déjà assez élevée, un segment curviligne concave en haut et à gauche (fig. 4). Nous observons alors une contraction maximale pour une dose plus faible que celle qui pourrait être prévue par la construction du composant α . Ceci nous mettrait en présence d'une population asymétrique (fig. 5) où une analyse permet de considérer non pas un mais deux mécanismes différents (J.L. PARROT, 1950). (fig. 4 et 5).

La même population d'effecteurs peut jouer sous deux modes distincts. Chaque unité biologique posséderait une aptitude réactionnelle différente vis-à-vis de deux mécanismes dont la nature-même nous échappe encore. Le second mécanisme entre en jeu précisément au moment où apparaît le segment curviligne qui quitte la droite et, à ce point, le phénomène résultant peut être considéré comme la somme des actions exercées par les mécanismes A et B et ne peut jouer que sur les unités contractiles actuellement disponibles.

Dans le cas des diagrammes d'allure simple, il semble bien, d'après les recherches en cours que ces deux mécanismes jouent mais composent entre eux de manière différente, ayant par exemple des actions parallèles, ou bien qu'une dispersion dans le temps des deux mécanismes masque toute sommation : c'est-à-dire que, à l'instant précis où B exerce son action, A n'est pas encore mis en jeu.

Nous savons maintenant qu'il est possible d'étudier autrement ces deux mécanismes grâce à l'étude conjointe de la morphologie des contractions soutenues en présence du glucose et du diagramme, méthode déjà envisagée au paragraphe II-A.

Dans les cas typiques, aux faibles doses, l'aspect du tracé des contractions est relativement simple : en forme de pointe ou de plateau ; à des doses plus élevées, précisément où sur le diagramme apparaît l'incursion de celui-ci, la contraction dessine d'abord un composant précoce (temps de latence) à la demi-hauteur de contraction (1 sec. 1/2 - 2 sec.) en forme de pointe ; après une déflexion plus ou moins profonde, la contraction reprend, soutenue, et dessine un dôme ou un plateau (fig. 3). Ces deux composants, précoce et tardif, peuvent être mesurés séparément et portés sur le diagramme (fig. 4). Les points représentant l'amplitude du composant qui apparaît dès les faibles doses (soit le premier, soit le second) suivent la droite.

L'apparition du composant qui faisait précédemment défaut correspond à l'apparition du segment curviligne et tend à suivre une droite dite B, telle qu'en avait pu la construire à partir des éléments déduits du diagramme complexe (voir la méthode de calcul proposée par J.-L. PARROT (1950) et reprise au paragraphe suivant).

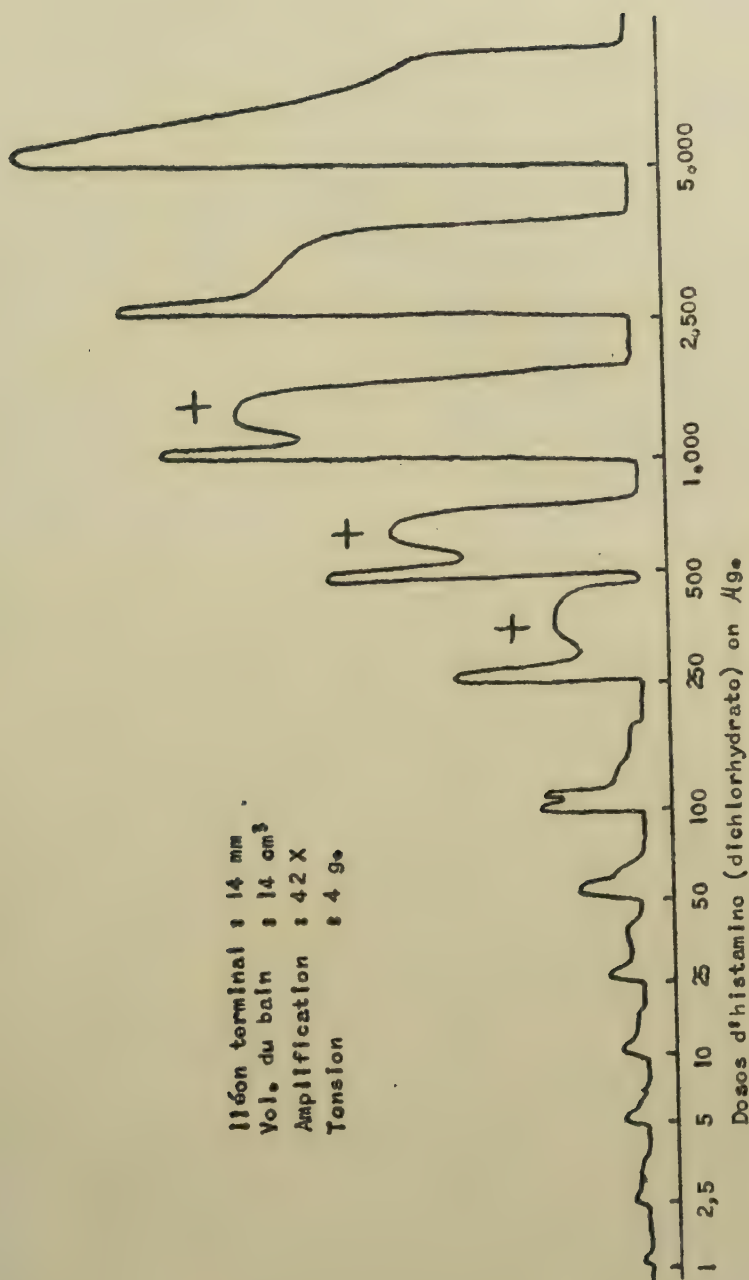


Figure 3 : L'amplitude de la contraction mesurée à chaque sommet est portée sur les diagrammes de la Figure 4 où chaque composant est analysé. Remarquons que le 2^{ème} sommet (+) de la contraction histaminique sp_0 dégage nettement pour la dose de 250/1,000 μ g d'histamine (dichl.).

Action (amplitude des contractions)
en p. 100.

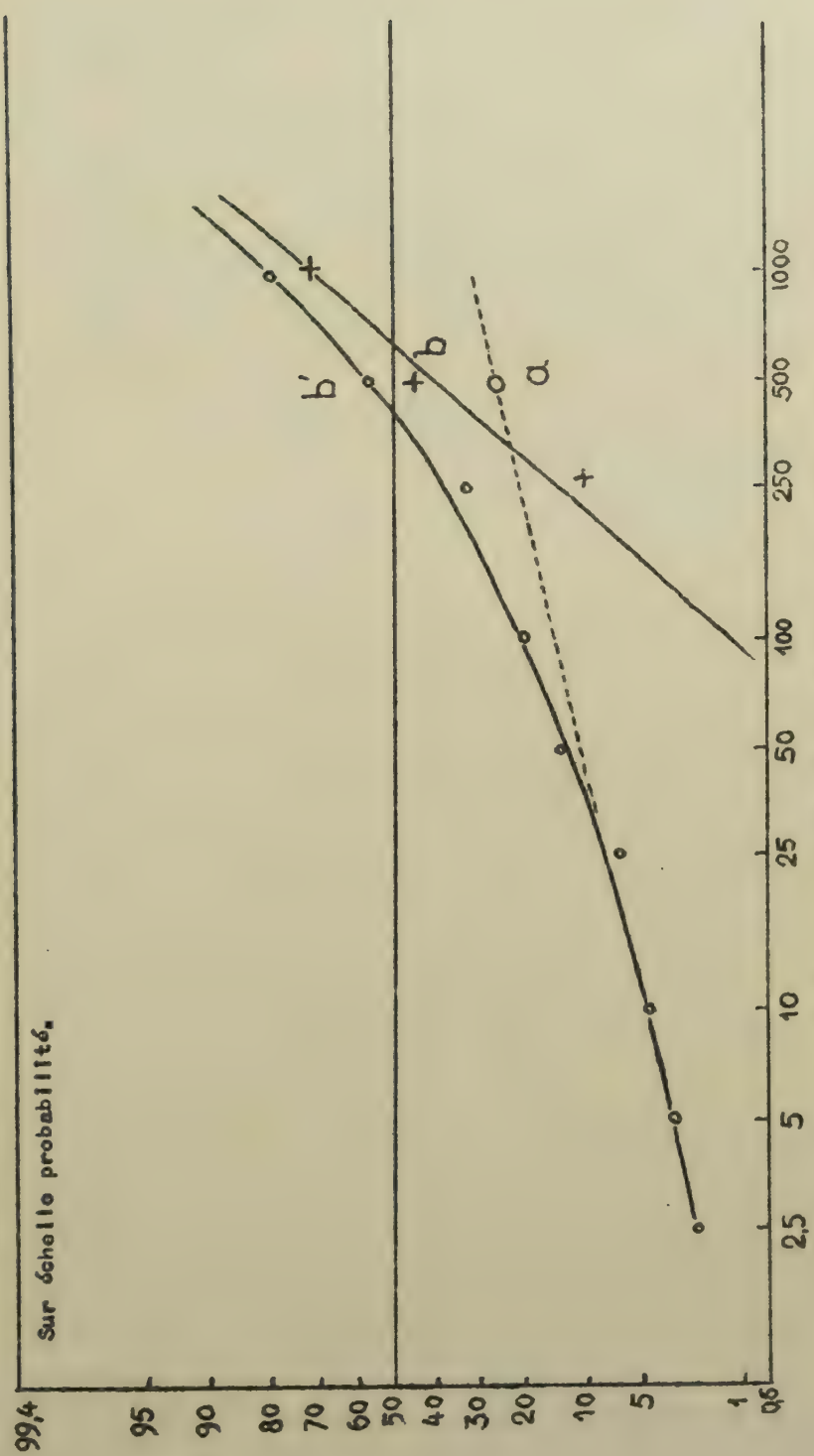


Figure 4 : Analyse et interprétation des données expérimentales de la Figure 3.

b.- ETUDE ET DONNEES NUMERIQUES RELATIVES AUX DIAGRAMMES ACTION-DOSE,

L'existence, dans un assez grand nombre de cas, de types de réponse conduisant à des diagrammes complexes, nous a conduit à définir les caractéristiques de ces divers types de diagrammes ainsi que la fréquence d'apparition de tel ou tel type de réponse de l'iléon de Cobaye à l'histamine. Ces données sont utiles pour connaître les conditions du dosage quant à la précision et à la sensibilité du test, qui dépendent de la pente du diagramme.

1°- Diagrammes simples.

Sur 272 diagrammes établis au cours de ces recherches, 90 se sont montrés complexes, soit : $1/3$ des cas. Les autres cas sont représentés par des diagrammes simples (Tableau I)

2°- Diagrammes à incurvation haute rectifiable, en réalité simples.

Parmi les diagrammes simples, certains présentent une incurvation en haut et à gauche pouvant prêter à confusion avec les diagrammes complexes, mais l'incurvation que peuvent présenter les diagrammes en réalité simples apparaît assez haut, au voisinage de 80 pour 100 de la réponse maximale et davantage, tandis que l'incurvation que présentent les diagrammes complexes est située aux environs de 50 p. 100 et même assez souvent au-dessus (fig. 4)

Or, dans les cas présentant une angulation haute, une correction de $\frac{m}{100}$ des

valeurs de chaque contraction permet d'obtenir une rectification parfaite (fig. 6). Ceci conduit à admettre que la contraction qui avait été prise pour maximale ne représentait en réalité que le $\frac{m}{100}$ de la valeur de la

maximale théorique. Soit m la contraction prise pour maximale, $M = 100$ la contraction maximale théorique. Cette réduction de $\frac{m}{100}$

T A B L E A U I

ACTION de L'HISTAMINE sur L'ILEON ISOLÉ du COBAYE

CARACTERISTIQUE DU DIAGRAMME ACTION-DOSE

CONCENTRATIONS MOYENNES EXPRIMEES EN μ G
de DICHLORHYDRATE D'HISTAMINE par CENTIMETRE CUBE

(Les chiffres entre parenthèses indiquent les limites entre lesquelles 68 pour cent des résultats se placent, ils sont fournis par le calcul de l'écart-type sur le logarithme des doses.)

Type de diagr.	Nb. de diagr.	Concentration correspondant à la contraction représentant 16 pour 100 de l'act.maximale (I)	Concentration correspondant à la contraction demi-maximale.	Concentration correspondant à la contraction représentant 84 pour 100 de l'act.maximale (I)
Rect.	70	0,033 (0,027 - 0,040)	0,110 (0,104 - 0,113)	0,354 (0,29 - 0,43)
Composite 36		α 0,037 (0,035 - 0,040)	0,38 (0,31 - 0,47)	3,90 (3,7 - 4,1)
		β 0,096 (0,035 - 0,26)	0,17 (0,072 - 0,40)	0,30 (0,11 - 0,81)

(I)- Ces valeurs ont été obtenues en partant de l'écart-type sur le logarithme des doses. Celui-ci est évalué en fonction de la pente de la droite correspondante obtenue dans le système logarithmo-probabilité (droite unique ou droites α et β suivant le cas); cet écart-type, qui caractérise le groupement des unités contractiles mises en jeu, est inversement proportionnel à la pente.

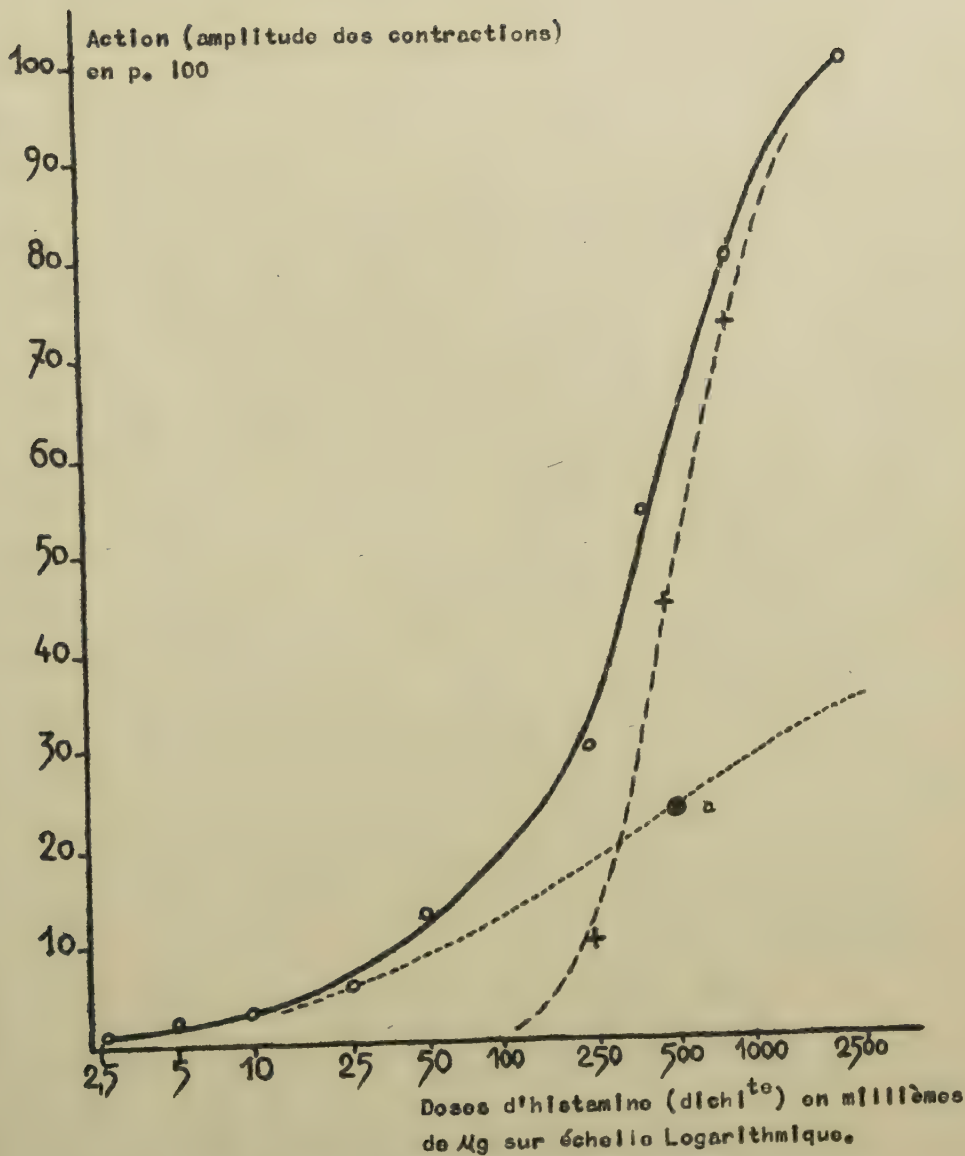
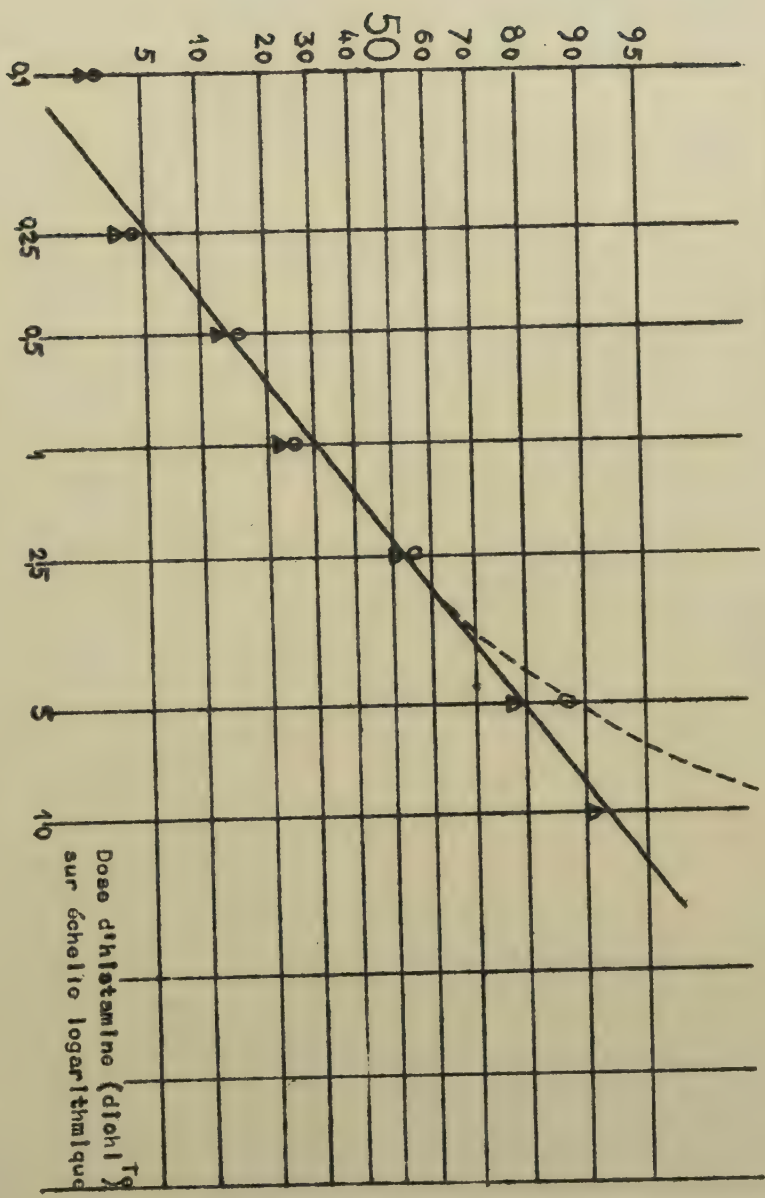


Figure 5 : Même diagramme représenté en coordonnées semi-logarithmiques.

Action en p. 100
sur échelle probabilité



Légende :

Inhibition portant sur les réponses au voisinage de la
contraction maximale — O — O

Rectification par correction de $\frac{m}{100} = \frac{90}{100}$ Δ-Δ

Maximale expérimentale ramené à $m = 90$

Pour une maximale théorique $M = 100$.

signifie que la contraction m prise pour maximale est affectée de $100 - \frac{m}{100}$

d'inhibition. On sait comment la reconnaître sur le tracé. Si P est la valeur d'une contraction en vraie grandeur, celle qui est directement fournie par l'expérience, et P_M la valeur théorique cherchée évaluée en pour 100, on a :

$$P_M = \frac{P \times \frac{m}{100}}{100}$$

Voici comment procéder pratiquement dans ce cas :

- 1.- On prolonge le segment de droite qui représente les points correspondant aux doses faibles ;
- 2.- L'ordonnée de ce prolongement pour l'abscisse correspondant à la dose pour laquelle on avait observé la plus forte contraction, soit ici 10 g d'histamine ($\log. 10+3 = 4$), est située aux environs de 90 pour cent. On opère alors les corrections de 90 p. 100 des valeurs pour 100 précédemment obtenues.

3.- Diagrammes complexes :

On y distingue le segment de droite a , répondant au mécanisme A, et l'apparition du segment curviligne concave en haut et à gauche correspond à l'entrée en jeu du mécanisme B qui vient se superposer au premier. Il s'agit là de la composition de deux diagrammes de sensibilité aux mécanismes A et B. Il est possible de les analyser de la manière suivante :
prolongeons la droite a (fig.4), le

point a correspond à a unités mises en jeu sur 100 ; le point b' correspond à la sommation des actions conjuguées des mécanismes A et B. La part qui revient à A représente les b' - a unités laissées disponibles par A, c'est-à-dire les b' - a unités mises en jeu sur 100 - a.

Ceci s'écrit :

$$\frac{b}{100} = \frac{b' - a}{100 - a}$$

d'où :

$$b = \frac{100(b' - a)}{100 - a}$$

Grâce à cette relation, il est possible de calculer point par point la droite B qui représente l'action de B supposé seul. Ceci nous permet d'indiquer les paramètres des deux types de réponses A et B (Tableau 1).

Voici quelques remarques utiles pour le dosage : les diagrammes complexes sont peu propices au dosage dans la zone de la droite où la pente est faible.

Quant au segment curviligne, la pente se relève ; la précision devient meilleure à condition toutefois d'utiliser des doses voisines donnant des réponses d'amplitude assez voisines.

Le tableau 1 contient des données qui ont été obtenues pour chaque type de diagramme. On remarquera que les diagrammes simples ont une pente intermédiaire à celles des droites α et β déniées plus haut pour les diagrammes complexes. Enfin, on aboutit, pour ce dernier type de diagramme, à définir, grâce à l'analyse qui vient d'être donnée, deux types de réactions α et β mettant en jeu une fraction donnée de la population totale. Quant à la nature de ces mécanismes, nous ne sommes encore réduits qu'à des hypothèses que viennent déjà appuyer quelques expériences pharmacologiques auxquelles nous avons fait allusion.

D.- QUELQUES PERSPECTIVES RELATIVES
A L'ACTION DE L'HISTAMINE
SUR L'ILEON DU COBAYE

a.- CONTRACTIONS HISTAMINIQUES ET MODIFICATIONS IONIQUES
DU MILIEU.

On savait déjà depuis BARSOUM et GADDUM (1935) que l'action de l'histamine était influencée par des modifications relatives de concentration en ions minéraux par rapport au liquide de survie utilisé. L'ion potassium, à la concentration de 2×10^6 et aux concentrations plus élevées, potentialise l'action de l'histamine ; à ces concentrations, l'effet propre est négligeable. Nous avons, nous-même, observé que de plus fortes concentrations en ions K (environ 10^{-3} de ClK) maintenues pendant 1 à 2 minutes, pendant lesquelles on observe des contractions en forme de pointe, avec tendance à la rythmicité, laissent après lavage un état de plus grande sensibilité à l'histamine, la potentiation portant surtout sur le composant précoce.

Nous avons étudié les modifications du diagramme action-dose et de la morphologie des contractions sous l'influence de substances qui sensibilisent la musculature lisse au potassium, telles que la vératrine et le sulfocyanure (BAGG Z.-M., 1939, 1941, 1942, 1947 et GODEAUX, 1942).

Or, dans ces conditions, le composant de pointe est potentialisé et les points correspondant à ce dernier sont situés au-dessus de la droite α , faisant apparaître pour des doses plus faibles le segment curviligne du diagramme, alors que les points correspondant au composant lent s'inscrivent toujours sur la droite α ; ils sont parfois même situés au-dessous de celle-ci, probablement à cause d'un certain degré d'inhibition.

Cette potentiation du composant précoce par les substances vératriniques laissait penser que l'ion potassium pourrait jouer un rôle dans un des mécanismes considérés. C'est pourquoi nous avons étudié la libération de potassium par l'iléon isolé de Cobaye en survie par des dosages effectués à inter-

valles réguliers, de Tyrode qui baigne l'organe dans le liquide. La quantité de potassium, que laisse diffuser l'organe, correspond à la quantité de potassium dosée dans l'échantillon prélevé, déduction faite de la quantité de potassium présenté dans le liquide de Tyrode témoin. Ces dosages effectués d'abord suivant la technique au cobaltinitrite a été poursuivie grâce à la photométrie de flamme. Or, nous savons maintenant que l'histamine est capable d'accroître beaucoup la quantité de potassium qui diffuse de l'intestin du cobaye en survie. (J.L. PARROT, J. THOUVENOT et S. LONGUEVALLE, 1952) (figure - 7 -) . certains effets de l'histamine pourraient s'expliquer par l'intervention du potassium ainsi libéré.

Si le balancement ionique est déplacé vers les ions antagonistes du potassium comme le calcium et le magnésium, on assiste à une réduction progressive de la sensibilité à l'histamine. Ce fait a été observé pour d'autres organes, comme l'utérus isolé de Cobaye, propriété qu'on met d'ailleurs à profit pour le dosage de l'hormone hypophysaire (YU-CHEN-HSU, 1948). Inversement, un appauvrissement en ions antagonistes du potassium (Ca et Mg) favorise l'action de l'histamine ; cependant, il y a lieu de réaliser une concentration optima : en effet, si le calcium est supprimé du liquide de survie, l'organe perd vite toute sensibilité à l'histamine.

La concentration optima semble réalisée en réduisant de moitié le taux de Ca Cl_2 présent dans le Tyrode normal (KWIATKOWSKI, 1941).

Il est remarquable de constater que le calcium, déprimant l'action de l'histamine, renforce l'action des antihistaminiques et que, par ailleurs, ceux-ci désensibilisent le muscle au potassium (J. LECOMTE).

b.- CONTRACTIONS HISTAMINIKES ET STRUCTURES NERVEUSES.

Les recherches récentes semblent montrer que l'action de l'histamine sur la musculature lisse de l'intestin peut s'exercer en dehors de toute intervention des structures nerveuses. En effet, l'inactivation des structures nerveuses de l'intestin peut être réalisée avec la cocaïne (W. FELDBERG et R.C.Y. LIN, 1947). Or, des concentrations de cocaïne voisines de 1 pour cent n'abolissent pas les réponses à l'histamine alors que les réponses à la nicotine sont

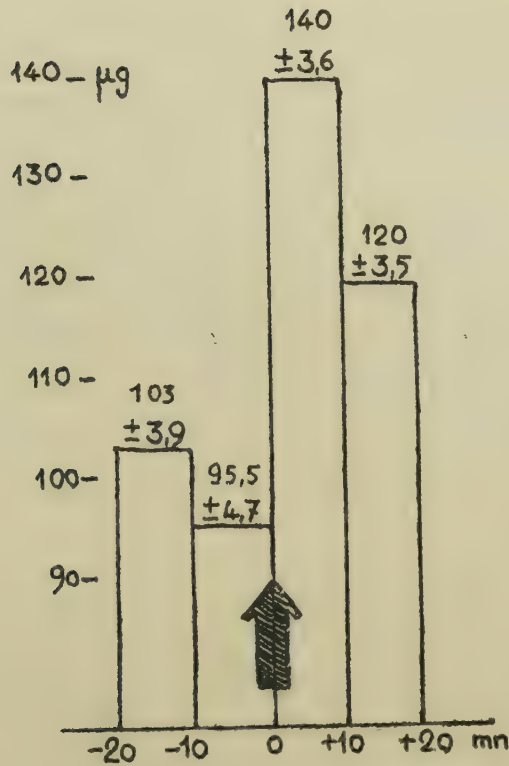


Figure 7 : Quantités de potassium libérées par l'intestin de Gobaye en survie.

(K/g/10m). L'histamine (HCl) est introduite au temps 0 (↑) à la concentration de 10^{-6}

Remarquer l'accroissement notable de la quantité de K sous l'influence de l'histamine qui atteint 46%. Les valeurs moyennes sont calculées sur 15 expériences.

déprimés. Ceci, concluent les auteurs, montre que l'histamine n'agit que sur la fibre musculaire (FELDBERG et LIN, 1947, et FELDBERG, 1951). Bien loin d'être déprimée, l'action de l'histamine peut même être renforcée par inhibition de l'activité nerveuse. En effet, comme le fait remarquer FELDBERG dans une récente discussion sur l'action des hormones locales (1950), certains inhibiteurs des structures nerveuses comme la tubocurarine, le tétraéthylammonium, l'hexaméthonium et la cocaïne, dans certaines conditions, sensibilisent l'intestin à l'action de l'histamine. D'autres faits restent à interpréter comme l'action dépressive de la spartéine, action qui ne relève pas d'une action antihistaminique, mais plutôt d'une action d'ordre antispasmodique (C. CAPRETTI et R. GUARNIERI).

D'autre part, AMBACHE et ROCHA E SILVA (1951) avaient remarqué que la nicotine, à la concentration qui provoque la paralysie ganglionnaire, déprime l'action de l'histamine alors que les réponses à la Bradykinine (I) n'étaient pas affectées d'inhibition. Ces auteurs n'interprètent pas l'action dépressive de la nicotine sur la réponse histaminique comme une action en rapport avec l'action ganglionnaire de la nicotine, mais plutôt comme un effet d'inhibition résiduel analogue à celui décrit par CANTONI et EASTMANN (1946) et auquel nous avons déjà fait allusion à propos de l'action de l'histamine. Ceci est ~~sur~~ dû sur le fait que cette action dépressive de la nicotine est fugace et qu'elle ne peut être mise sur le compte de l'action ganglioplégique.

Ces recherches méritent d'être reprises car on ne sait, d'après ces travaux, de quel composant il s'agit, puisque nous pouvons, maintenant, étudier directement chaque composant.

(I) Substance issue de l'action protéolytique de la trypsine ou du venin de serpent (genre Bothrops) sur les globulines du plasma.

III.- LE DOSAGE BIOLOGIQUE

A.- QUELQUES POINTS D'ORDRE TECHNIQUE

a.- LES ANIMAUX UTILISES.

Il est préférable d'utiliser des cobayes mâles pesant de 250 à 300 gr. La durée du jeûne peut être de 8 heures environ. Il est nécessaire que ces animaux soient soumis à un régime pauvre en aliments verts ; on sait, en effet, que la carence modérée en acide ascorbique et en vitamine C augmente la sensibilité à l'histamine. Il faut, cependant, éviter une carence nette qui trouble la courbe pondérale.

b.- LE TEST, LE BAIN.

L'animal étant sacrifié par saignée, on prélève deux fragments d'iléon d'une longueur de 3 cm. environ, qui doivent être soigneusement débarrassés de tout contenu par lavages au liquide de Tyrode. Ils sont reçus dans un bain de ce même liquide dont la composition est pour mille :

Cl Na, 8 - ClK, 0,2 - Cl² Ca, 0,2 -
Cl² Mg, 0,1 - bicarbonate de Na, 1 gr.

Le volume du bain, environ 10 cm³, peut être réduit facilement à 5 cm³. Pour le dosage, l'emploi de Tyrode glucosé n'est pas recommandé car, dans ces conditions, les points sont plus dispersés sur le diagramme. De l'atropine (sulfate) (I) est introduite dans le liquide de Tyrode, à une concentration classique de $\frac{1}{10} 10^{-7}$. Le bain est maintenu à 36°. (2) 2

Un barbotage d'air assure une oxygénation suffisante et l'agitation qui rend la composition du bain homogène après introduction des solutions à tester.

(I) L'atropine a pour but d'antagoniser sur le test les substances type acétylcholine.

(2) Certains auteurs (ZADINA, 1947) recommandent une température plus basse : environ 32°

c.- L'APPAREIL D'ENREGISTREMENT, LE LEVIER MYOGRAPHIQUE, CRITIQUE ET AMÉLIORATION.

Nous enregistrons les contractions au moyen d'un levier isotonique à inscription frontale.

Or, pour obtenir et étudier le diagramme action-dose, il est nécessaire de connaître la valeur de la contraction maximale, celle qui met en jeu la totalité des effecteurs ; or, l'enregistrement des contractions de grande amplitude peut être entaché d'erreurs dues au fait que le levier présente des défauts d'isotonie : la tension exercée par le levier sur le muscle étant différente lorsque le levier s'écarte beaucoup de l'horizontale. Nous avons adopté le dispositif décrit par SCHILD H. O. (1947), qui déplace, au moyen d'une surcharge placée sur une tige filetée fixée sur l'axe, le centre de gravité, de manière à ramener celui-ci le plus près possible de l'axe de rotation du levier, rendant l'équilibre du système indifférent pour une tension donnée (fig. 8).

Le réglage peut se faire en agissant sur l'inclinaison de la tige filetée et par rapport à la tige du levier MOM' et en déplaçant une masse, celle que constitue un écrou moleté v.

Une deuxième cause d'erreur provient de ce fait qu'aux fortes amplitudes, la hauteur du tracé n'est plus proportionnelle au raccourcissement de l'intestin. En effet, dans l'inscription frontale, le levier inscrit ses déplacements grâce à un style qui s'articule à l'extrémité du levier. Ce style, par sa mobilité autour de son articulation, a pour but de combler l'espace variable, suivant les amplitudes qui séparent la génératrice du cylindre à l'extrémité du levier (fig. 8).

Or, la construction géométrique (fig.9) montre que l'inscription est entachée d'une erreur par excès, et celle-ci est d'autant plus importante que le style est plus court. SCHILD (1944), qui a étudié cette question, montre que, pour un style de 2 cm., l'erreur commise atteint

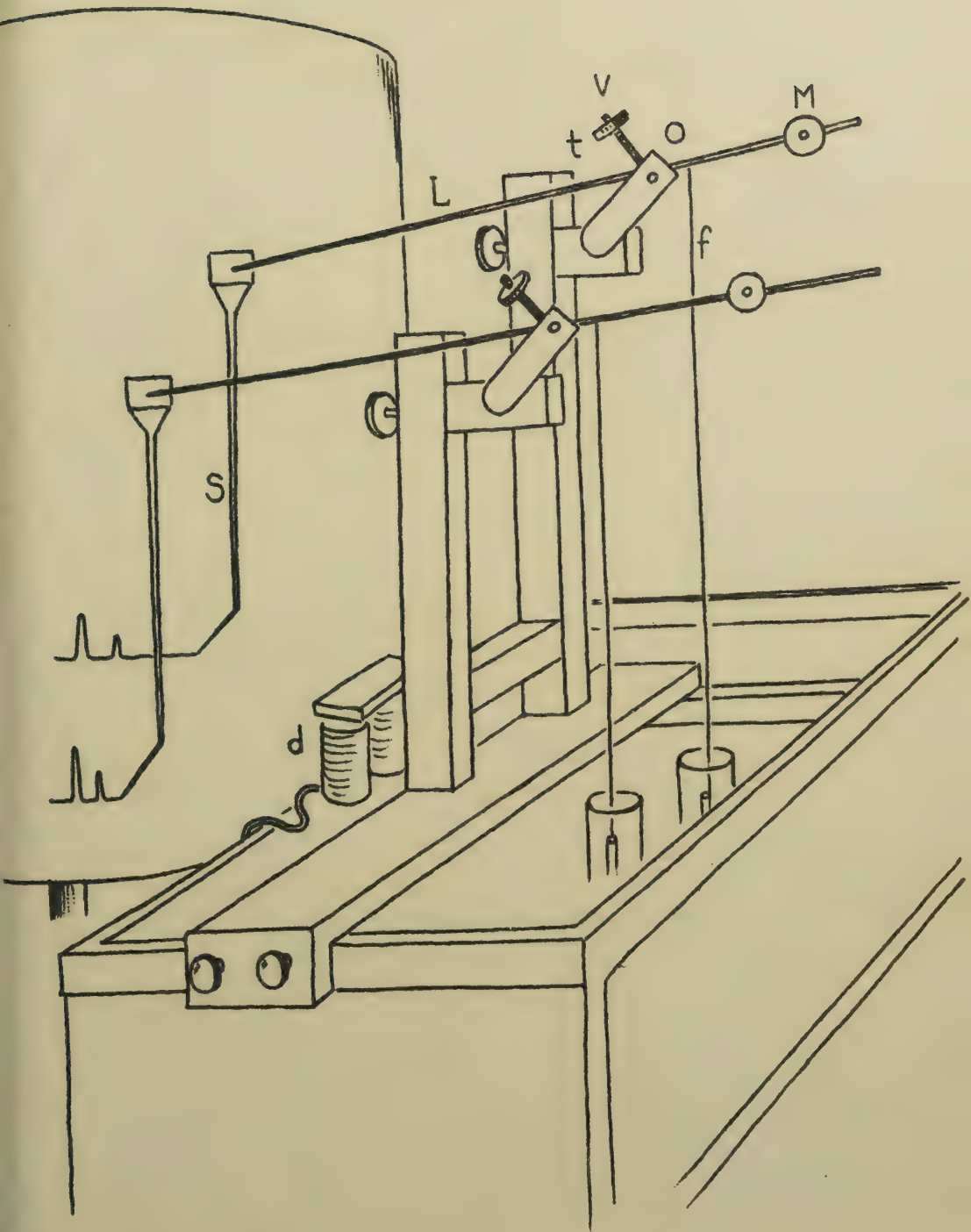


Figure 8

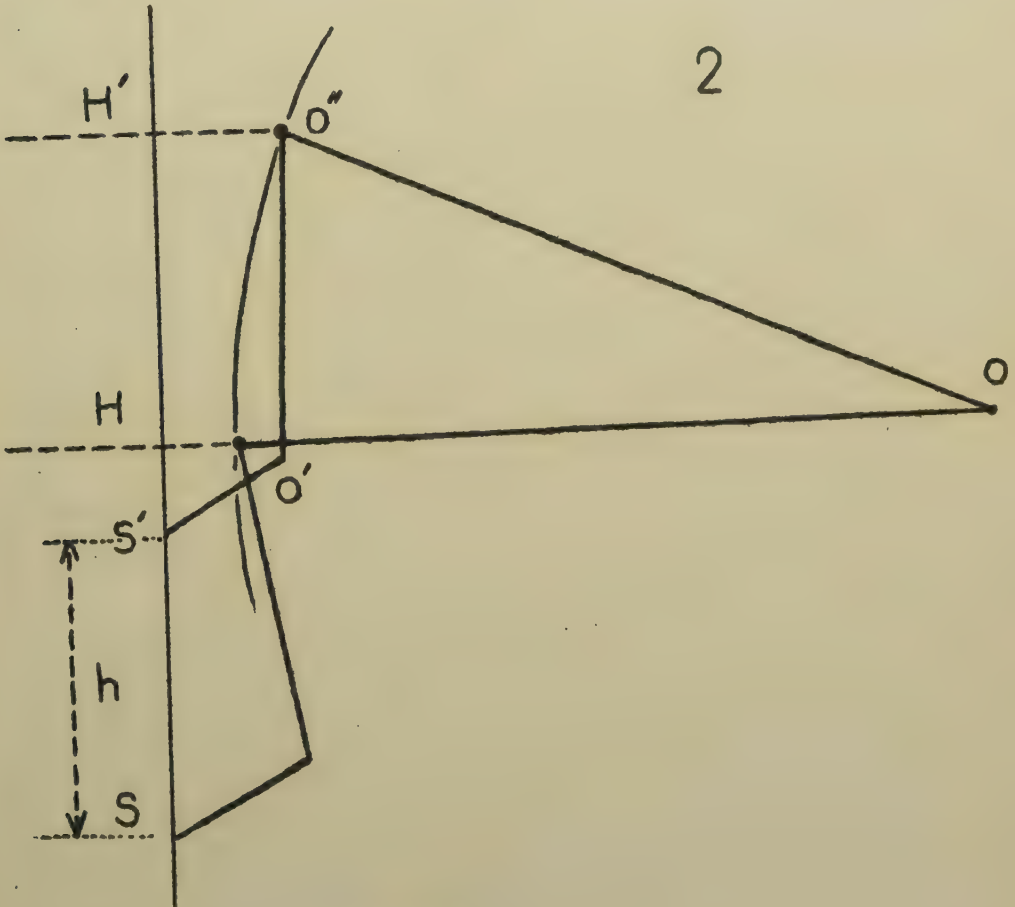
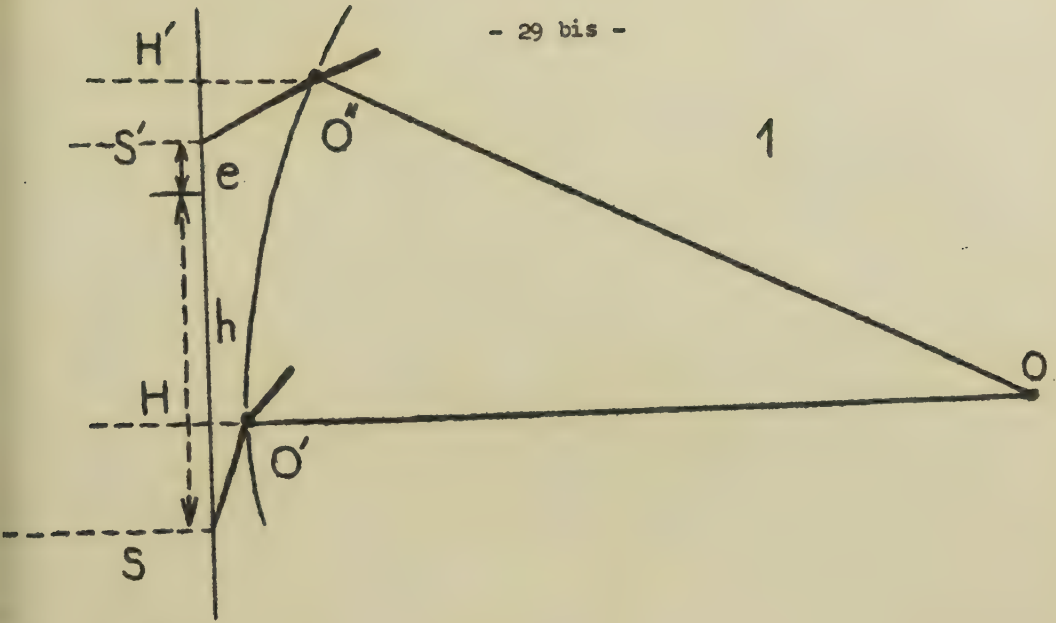


Figure 9

10. pour cent pour une excursion de levier de 30° par rapport à l'horizontale. Celle-ci ne dépasse pas 0,5 % si, pour cette même amplitude, le style est long de 30 cm. Il est donc nécessaire d'utiliser un long style dont la longueur optimale est égale à celle du long bras du levier. Afin de vaincre les frottements, essentiellement dus à ceux du style sur la surface enfumée du cylindre, le support sur lequel le levier inscripteur est monté est rendu solidaire d'une armature A animée d'impulsions que crée sur elle un électre-aimant E parcouru par un courant alternatif redressé.

B.- PRATIQUE DES ESSAIS SUR L'INTESTIN ISOLE

Il est classique d'attendre 20 à 30 minutes avant de procéder aux essais, temps pendant lequel l'organe s'adapte à ces nouvelles conditions de bain, de tension, etc... Or, la répétition systématique de la même dose d'histamine montre qu'au bout de cette période, l'organe n'est pas susceptible de répondre régulièrement à celle-ci. Nous avons remarqué (I) qu'en effectuant des stimulations à des doses décroissantes d'histamine, la stabilisation était rapidement obtenue, on observe une chute importante du tonus et une augmentation de la sensibilité. En procédant ainsi, on sait à quel moment la sensibilité est stable et alors les essais peuvent être effectués. En réalité, le délai de stabilisation est assez variable suivant l'organe prélevé.

Un autre facteur que nous avons reconnu comme agissant sur cette stabilisation est : la tension appliquée à l'organe; une tension forte de 3 - 4 gr. permet une stabilisation plus rapide. C'est la tension que nous appliquons le plus souvent.

On introduit la solution d'histamine dans le bain sous 1/2 cm.³ afin d'éviter des variations importantes du volume, et ceci rapidement. Il est nécessaire de s'assurer au préalable que le volume du bain soit bien constant d'un essai à l'autre. L'organe est laissé en contact avec l'histamine le temps suffisant pour que la contraction puisse dessiner son sommet sur le tracé. Le bain est alors complètement évacué et remplacé par du Tyrode juste qu'en haut du tube, immergeant l'organe, ceci afin d'entraîner les traces d'histamine qui pourraient s'y trouver. On procède ensuite à des lavages qu'il convient d'espacer régulièrement. Deux à trois lavages successifs pourraient être inefficaces pour assurer un retour à la sensibilité primitive de l'organe. L'espacement régulier des lavages permet d'éliminer l'histamine défixée progressivement par l'organe.

Il est classique d'attendre 3 minutes entre chaque contraction et 1 minute après le dernier lavage, pour procéder à un nouvel essai. Le délai de 2 minutes est un intervalle qui peut être suffisant pour les doses faibles ; en effet, nous avons observé que la sensibilité augmente beaucoup sous l'influence des doses faibles, et certaines réponses pourraient même être potentialisées par répétition. Il est donc préférable d'espacer les essais de 3 minutes.

(I) Ainsi que M. Beauvillain, communication personnelle, 1950.
Le fait s'observe pour d'autres substances comme l'acétylcholine (Andral, Blatzot J. et Blatzot S. (1951).

Ainsi que nous l'avons remarqué bien souvent, il est de la plus haute importance d'effectuer les essais à intervalles très réguliers sinon la sensibilité risque de changer. Tout se passe comme si l'organe s'adaptait aux conditions qu'on lui impose et le moindre décalage dans le temps des diverses opérations risque de compromettre la fidélité des réponses de l'intestin. C'est une des raisons pour lesquelles certains auteurs ont recours à des appareils où le remplissage et l'évacuation du bain sont automatiques (SCHILD, 1946-1947).

Afin d'obtenir les éléments critiques du dosage, il est nécessaire de construire le diagramme action-dose. Une série de doses croissantes d'histamine sont essayées à intervalles réguliers jusqu'à l'obtention de la réponse maximale. Celle-ci est obtenue lorsque la réponse n'augmente plus à partir d'une certaine dose. Souvent, l'amplitude décroît en augmentant la dose. Cependant, et il est nécessaire d'y insister, c'est surtout aux doses fortes que se manifeste au plus haut degré ce phénomène d'inhibition que provoquent des traces d'histamine fixées à l'occasion d'un nouveau contact avec celle-ci. C'est cet état réfractaire auquel nous avons déjà fait allusion. Lorsqu'un tel phénomène est observé, il faut attendre suffisamment, procéder à de nouveaux lavages et on peut soumettre le test à l'action du Cl K (2,5 à 5 milligrammes pour un bain de 10 cm³). On sait que le Cl K diminue l'état réfractaire après de fortes doses d'histamine (CANTONI et EASTMANN, 1946). On peut aussi, au début de l'expérience, dès que la stabilité des réponses est obtenue, provoquer une contraction d'emblée maximale par une dose assez élevée (10 à 50 g) de dichlorhydrate d'histamine pour un bain de 10 cm³, puis attendre, laver et reprendre des doses décroissantes pour retrouver une bonne sensibilité. On peut procéder d'une manière différente sur les deux segments d'intestin dont on dispose.

C. RAPPEL DES METHODES CLASSIQUES DE DOSAGE;

LEUR CRITIQUE

Classiquement, on compare l'activité de la solution inconnue à celle que produit une quantité connue d'histamine ; on essaie par tâtonnements plusieurs dilutions de la solution à doser en intercalant des quantités connues choisies de telle sorte que que celles-ci aient une activité comprise entre deux doses connues. Le logarithme de la dose inconnue est alors la moyenne des logarithmes des deux doses voisines. Ceci suppose que l'action est proportionnelle au logarithme de la dose. La comparaison entre doses connues et inconnues peut être rendue plus rigoureuse en utilisant la méthode du Carré Latin introduite par BLISS et MARKS (1939) dans les essais biologiques (1).

Elle suppose des essais préliminaires qui ont pour but de choisir deux dilutions des deux solutions connue C et inconnue I, une faible et une forte f ; les activités des deux solutions faibles connues et inconnues doivent être choisies aussi voisines que possible. On a ainsi à tester l'activité de 4 solutions Ce, Cf, Ie et If. Ces 4 déterminations seront effectuées à la suite plusieurs fois dans un ordre quelconque tiré au sort, par exemple Cf, Ie, If, Ce.- Ce, Ie, Cf, If, etc... Les valeurs moyennes obtenues permettent de calculer le logarithme de la puissance de l'inconnue. La pente de la ligne de régression et les paramètres qui permettent le traitement statistique des données, en particulier d'effectuer l'analyse de variance (SCHILD, 1942 ; D. QUIVY et I. BERTRAND, 1948). Ces méthodes supposent que la grandeur de l'action est proportionnelle au logarithme de la dose ; or, reportons-nous au diagramme : cette supposition n'est valable que si les déterminations d'activité sont effectuées dans la zone médiane de celui-ci (entre 20 et 60 pour 100 de l'action maximale), c'est-à-dire pour les doses moyennes. Ceci implique que, dans les méthodes précédentes, les essais soient faits dans la zone des doses moyennes. S'il s'agit d'un diagramme complexe, les calculs précédents pourraient conduire à des résultats entachés d'une certaine erreur. L'erreur peut être importante au voisinage des zones extrêmes du diagramme ; or, si nous ignorons la valeur de la réponse maximale, on peut fort bien dans les méthodes classiques, travailler dans cette zone. Le diagramme constitue ainsi un document qui permet la critique du dosage. La droite de régression obtenue sur deux ou quatre points dans un Carré Latin n'est justifiée que si les doses sont assez voisines car supposons un test caractérisé par un type de réponse correspondant à un diagramme complexe ; dans ces conditions, la partie médiane de ce diagramme est assez souvent déjà concave et c'est précisément la zone où on se situe pour le dosage : si les points sont rapprochés, c'est-à-dire si les doses sont assez voisines bien que différentes, la droite de régression obtenue dans la méthode de SCHILD sera, en réalité, un segment tangent à la zone incurvée et, pratiquement, confondu avec elle. Ceci interdit toute extrapolation, c'est-à-dire toute évaluation au-delà des li-

(1) Voir d'autres applications de la méthode du carré latin dans le dosage de l'histamine (QUIVY et BERTRAND 1948), adrénaline (BERTRAND et QUIVY 1947) extraits post-hypophysaires (BURN, FINNEY et GOODWIN, op. cit., etc.,).

mites du segment considéré. Cependant, bien conduite, la méthode de l'essai à " 4 points" suivant SCHILD est excellente et hors de critique. Cependant, sa mise en oeuvre et les calculs qu'elle entraîne rendent cette méthode difficilement applicable au dosage de l'histamine en clinique. D'ailleurs, pour être bien conduite, cette méthode exige la succession des opérations à un rythme très constant et le mieux est de recourir, pour cela, aux appareils automatiques analogues à celui que propose SCHILD (1946 - 1947)(1)

D.- TECHNIQUE DE L'ESSAI, SUIVANT LA METHODE PROPOSEE

La méthode que nous décrivons est une méthode simplifiée applicable à la clinique. La conduite des opérations se fait de la manière suivante : Lorsque la sensibilité est bien constante, on cherche à connaître rapidement quelles sont la dose liminaire et la dose maximale en effectuant une série de doses croissantes. On évalue ainsi la dose qui provoque la contraction demi-maximale, c'est là que la sensibilité différentielle est la plus grande, autrement dit, que nous nous situons comme précédemment dans la zone de plus grande pente du diagramme représenté en coordonnées semi-logarithmiques par une courbe en S, c'est-à-dire, dans la "zone médiane de l'S"(fig.1) Dans ces conditions, on choisit la dilution de l'extrait à doser qui permet d'obtenir des réponses dans cette zone. On intercale l'essai des solutions à doser entre deux essais de solutions à dose connue donnant des réponses assez voisines. On peut se servir des données acquises pour essayer ensuite d'autres extraits à doser par rapport aux extraits précédents lorsque la sensibilité reste assez constante.

(1) Pour l'application de cette méthode voir J.H. Gaddum et F. Lembeck, Brit. J. Pharm. 1949, 4, 401.

E.- DETERMINATION DES RESULTATS

On procèdera ainsi :

a.- Construction du diagramme avec les réponses aux doses connues évaluées en pour cent de l'action maximale.

b.- La hauteur de chaque contraction obtenue avec les solutions inconnues également évaluées en pour 100 de l'action maximale est représentée de la façon suivante ; à partir des ordonnées correspondant à ces réponses, on trace des parallèles à l'axe des abscisses. L'intersection de ces droites avec la droite ou le segment de droite représentant le diagramme, reportée sur l'axe des abscisses, permet de déterminer la dose cherchée. Reste à déterminer la marge d'erreurs ; pratiquement, nous pouvons l'évaluer avec une sécurité suffisante de la manière suivante :

1.- Evaluation de la variance correspondant à la dispersion de la droite. Pour cela, on évalue l'écart en pour 100 des points autour de la droite représentative :

Soit $S(Z)$ la somme de ces écarts pour n points :

la variance est :

$$v(c) = \frac{s(Z)^2}{n(n-1)} \quad (1)$$

2.- Evaluation de la variance correspondant à la dispersion des réponses aux solutions inconnues. Soient 3 réponses obtenues avec l'extrait à doser x .

La réponse moyenne est $\bar{x}$. La somme des écarts à cette moyenne est $S(x-\bar{x})$.

La variance est :

$$v(i) = \frac{S(x-\bar{x})^2}{n(n-1)} \quad (2)$$

La variance correspondant à la dispersion des ordonnées peut être évaluée par la variance totale $v(c) + v(i)$ dont :

$$\sqrt{v(c) + v(i)}$$

représente la dispersion elle-même. A ces écarts ainsi définis en ordonnée correspondent les abscisses des points d'intersection de ces lignes d'écart

avec la droite représentant le diagramme. L'écart entre celles-ci dépend de la pente de la droite. On se trouve dans de meilleures conditions lorsque celle-ci est assez forte. Prenons un exemple (fig. 10) : le diagramme représente une droite de régression ajustée. Les ordonnées correspondant aux réponses obtenues avec un extrait x sont respectivement 39 - 21,5 et 30,5 pour 100 de l'action maximale.

La moyenne est :

$$\bar{x} = \frac{39 + 21,6 + 30,3}{3}$$

L'abscisse correspondant à l'intersection de cette ordonnée 30 pour 100 avec la droite représentant le diagramme répond à une dose de 0,25 g d'histamine dichlorhydrate.

La variance de la dispersion des points du diagramme, évaluée directement, est calculée d'après la formule (1)

$$V(c) = \frac{358}{11 \times 10} = 3,25.$$

La variance de la dispersion des ordonnées correspondant aux réponses obtenues avec l'extrait x, déterminée à l'aide de la formule (2) est :

$$V(i) \neq 25.$$

La variance correspondant à l'erreur totale est :

$$V = V(c) + V(i) = 3,25 + 25 = 28,25.$$

L'erreur standard obtenue ainsi est :

$$e = \sqrt{V(c) + V(i)} = \sqrt{28,25} \neq 5,3.$$

Un écart de $\pm 5,3$ pour 100 autour de la moyenne de la réponse inconnue correspond à des doses comprises entre 0,2 et 0,35 μg . La réponse cherchée est la suivante : l'essai étant réalisé sous 1/2 cm³, 1/2 cm³ de la solution x correspond à une activité comprise entre 0,2 et 0,35 μg , la moyenne correspondante étant 0,25 μg de dichlorhydrate d'histamine. Soit 500 μg par litre. On peut s'attendre à des variations allant de 400 à 700 μg . En réalité, ces limites correspondent à une marge de sécurité très large. Ceci provient

de l'évaluation par excès de la dispersion des points autour de la droite basée sur le carré des écarts des points à la droite qui représente déjà l'axe de gravité du système. Cependant, le chiffre correspondant à $v(c)$ est faible par rapport à la dispersion des points (correspondant à $v(i)$) correspondant aux réponses obtenues avec l'extrait à doser. (I)

Les formules ci-dessus ne sont applicables que lorsque l'on a répété plusieurs fois l'essai d'une même dose, c'est le cas notamment, comme dans l'exemple ci-dessus où l'intestin-test bien que sensible présente un manque de fidélité dans ses réponses, ce qui oblige à répéter plusieurs fois l'essai des mêmes solutions.

Nous avons choisi cet exemple (fig. 10) où la dispersion est assez grande pour pouvoir représenter clairement le procédé graphique de détermination de l'erreur par cette méthode. Dans cet exemple, l'erreur correspondant à ces limites autour de la moyenne sont : en plus, 0,1 et en moins, 0,05 par rapport à la valeur trouvée 0,25 μ g, soit des variations de 40 pour 100 en plus et 20 pour 100 en moins. Cette dispersion devient plus faible en obtenant un plus grand nombre de réponses avec la solution à doser, il faut alors opérer sur un papier logarithme-probabilité à grande échelle.

Une méthode plus simple et généralement suffisante consiste à tracer, de part et d'autre de la droite qui représente le diagramme, des lignes d'enveloppes correspondant aux points dont l'écart à la droite est maximum (fig. 11 et fig. 12). L'intersection des horizontales correspondant aux réponses obtenues avec la solution à doser avec ces lignes d'enveloppes reportées sur l'échelle des abscisses fournit la marge d'erreur assez voisine de la quasi-certitude. Celle-ci dépend de l'ordonnée de l'intersection dont nous venons de par-

(I) La critique statistique des données basée sur le calcul sortirait du cadre que nous nous sommes proposé, notre but étant d'indiquer une méthode graphique simple.

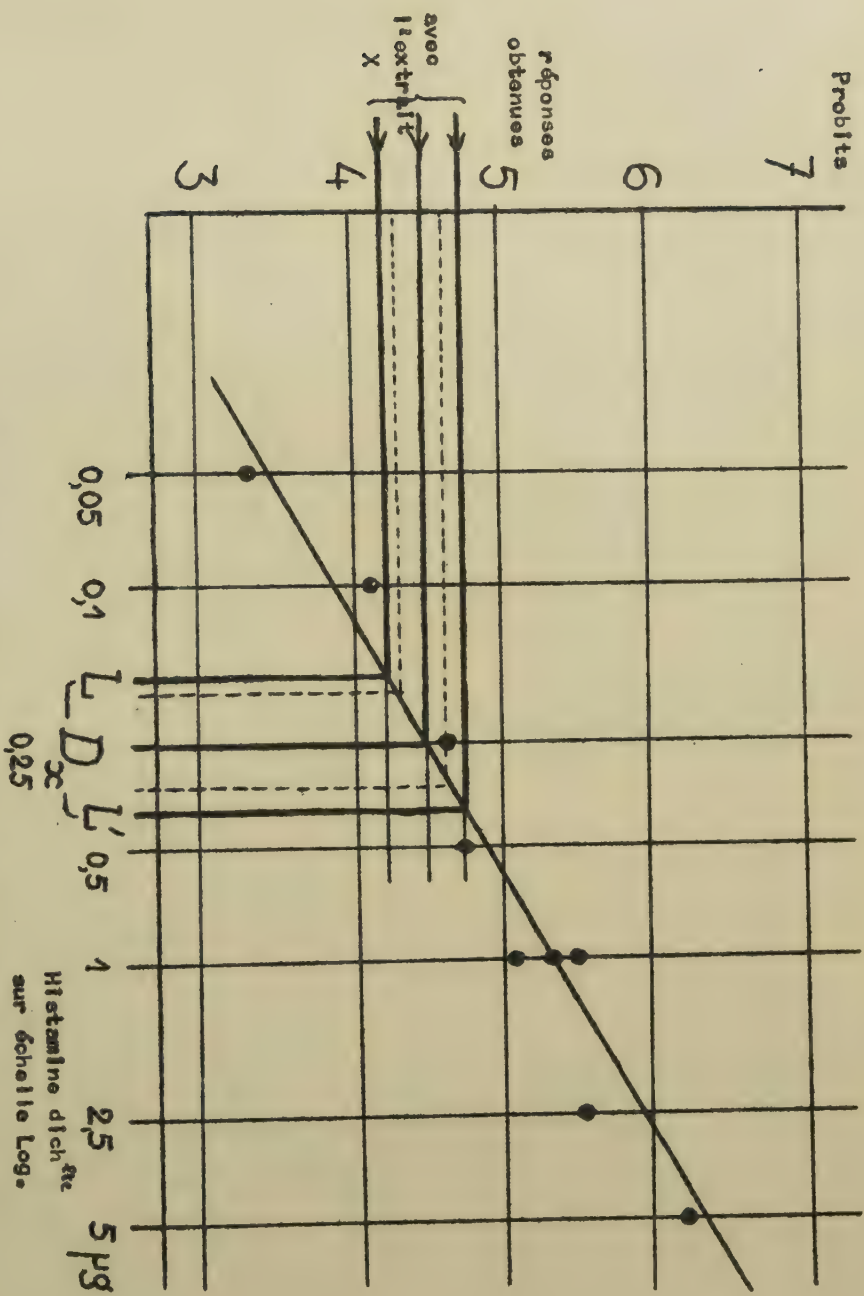


Figure 10 : Analyse graphique des données pour le dosage de l'histamine dans un extrait (voir le texte)

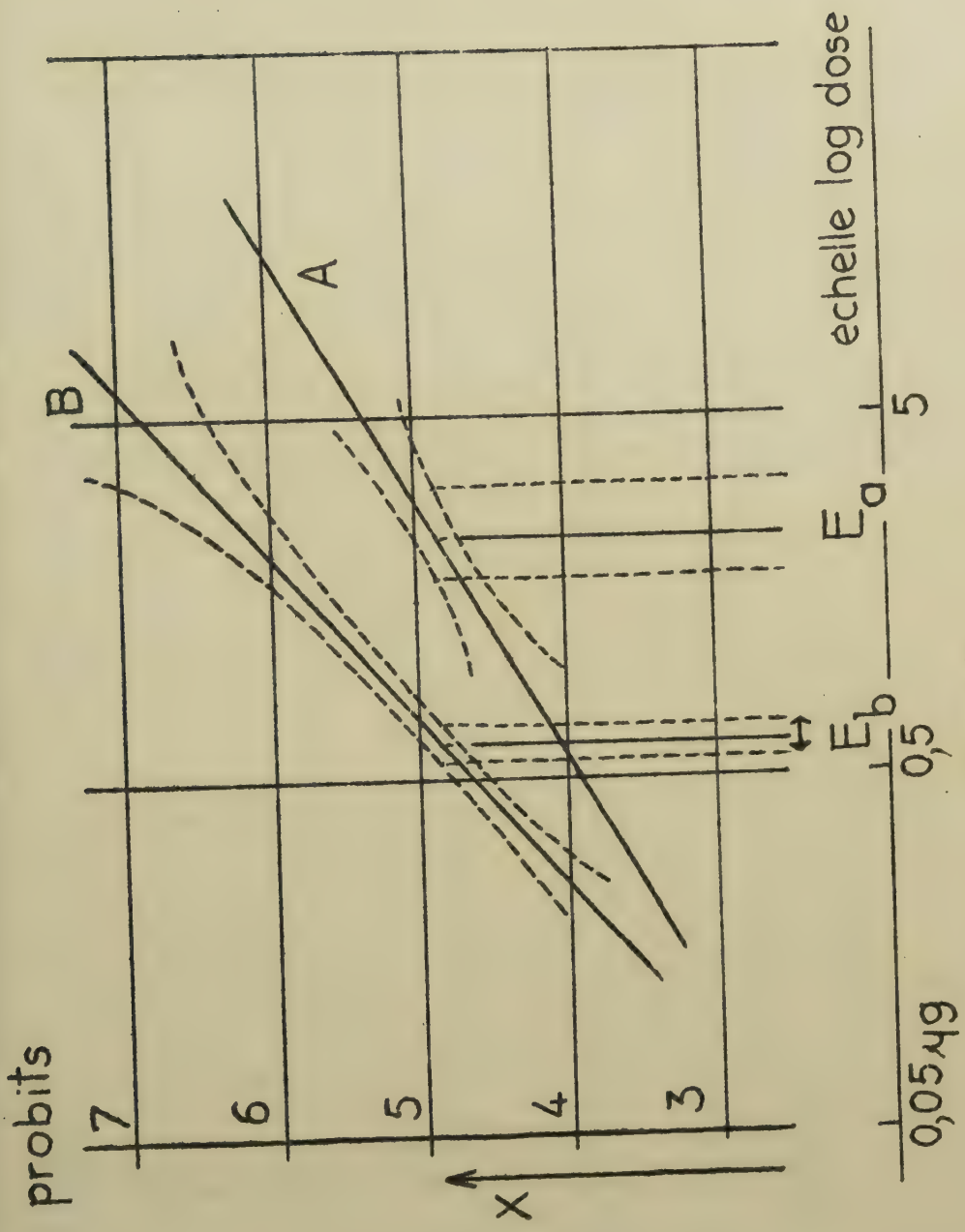


Figure II

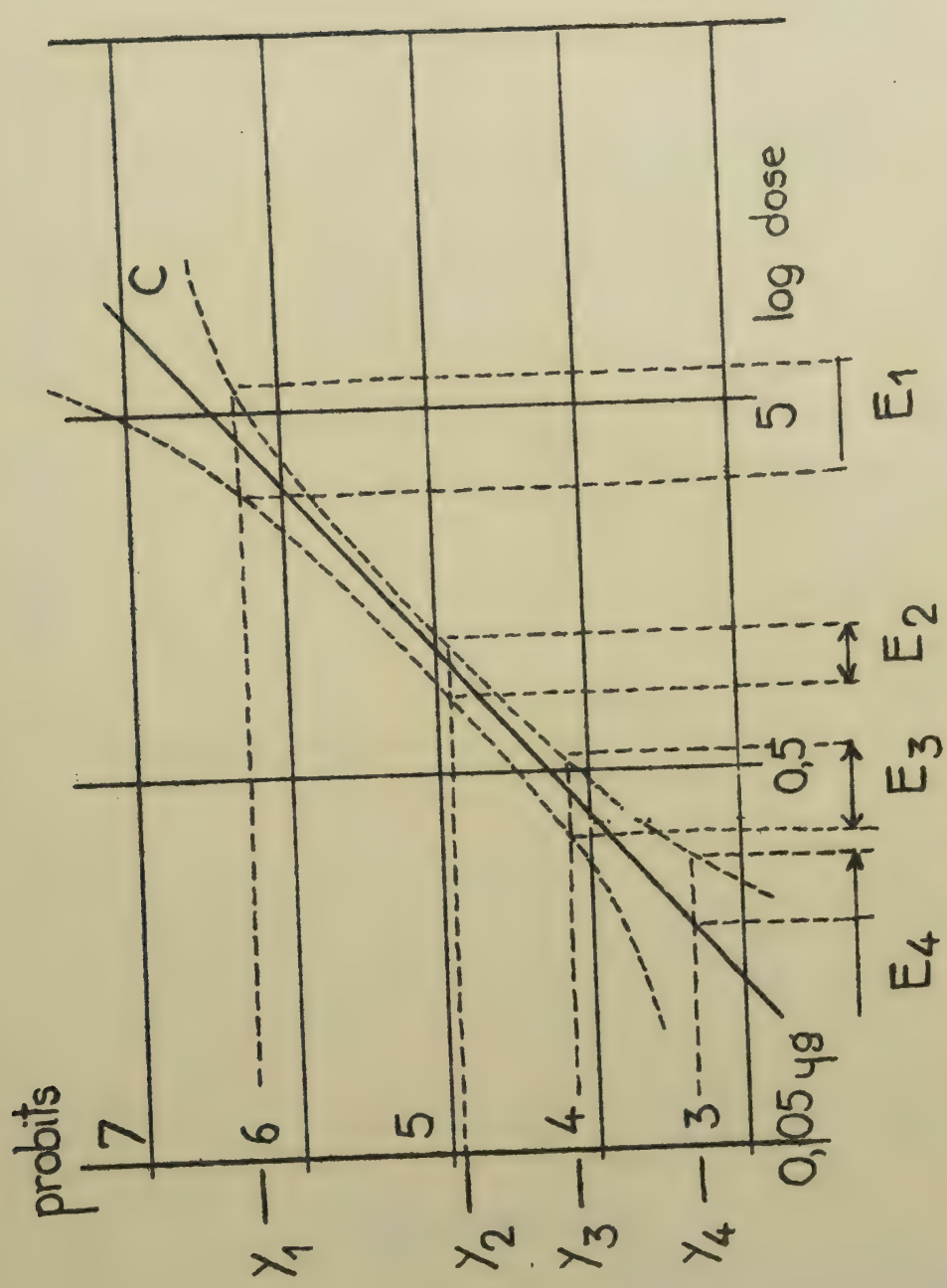


Figure 12

ler ; l'erreur est minima au voisinage de l'ordonnée 50 pour 100. Pour une même ordonnée, la marge d'erreur dépend de la pente (fig. II).

UN CAS PARTICULIER. Lorsque l'extrait à doser semble contenir beaucoup d'histamine, il est possible d'opérer pour le dosage de la manière suivante : on prépare et on essaie plusieurs dilutions connues de la solution à doser (par exemple au 1/10 et au 1/5). On procède ainsi à l'interprétation des résultats :

- I.- On établit le diagramme action-dose avec les réponses aux doses connues.
- 2.- Sur un autre papier logarithme-probabilité, on représente les ordonnées correspondant aux doses x ; $0,5 x$; et $0,1 x$ par exemple, et en abscisse les logarithmes correspondant aux coefficients 1 ; $0,5$; $0,1$. L'abscisse de la dose choisie pour origine est prise arbitrairement (puisque elle est inconnue). On reporte, au moyen d'un calque, ces points sur le diagramme obtenu avec les doses connues ; en faisant glisser le calque, on arrive à faire superposer les points correspondant aux inconnues, de manière à les faire rentrer dans le diagramme en tenant compte d'une dispersion éventuelle. Les abscisses correspondantes permettent de déterminer les doses x ; $0,5 x$; $0,1 x$. La dispersion des points par rapport au diagramme permet facilement l'évaluation de la dispersion et, par suite, de l'erreur.

PRECISION DES ESSAIS.-

D'après la statistique que nous avons entreprise, la dispersion moyenne pour 100 diagrammes établis sur 6 points est de : 3,8 pour 100. Dans ces conditions, l'erreur relative sur la dose est de 10 à 15 pour 100 selon la pente. Pour gagner en précision,

il est nécessaire d'établir le diagramme en procédant à des essais régulièrement espacés, en commençant, pour les solutions-étalon, dès le seuil d'action et en prenant les précautions indiquées pour obtenir la contraction maximale.

On parvient à améliorer la précision par la répétition des essais des solutions à doser interpolées entre deux doses voisines et par la critique des données rapportées sur le diagramme action-dose. Dans les meilleures conditions, l'erreur peut être de l'ordre de ± 3 à 4 pour 100.

Tout dépend de la précision que l'on désire obtenir. Si le dosage est demandé pour orienter un diagnostic, un chiffre trouvé tel que $60 \mu\text{g}$ d'histamine par litre de sang avec une erreur d'environ $\pm 12 \mu\text{g}$ soit 20 pour 100, ou même $\pm 20 \mu\text{g}$ soit 33 pour cent, est suffisant pour dire que l'histaminémie est normale, c'est-à-dire inférieure à 80 ou même $100 \mu\text{g}$ par litre de sang. En revanche, si au cours d'une étude de l'action d'un mécanisme physiopathologique ou un dosage pharmacologique, on a à comparer 2 extraits d'activité voisine pour examiner s'ils diffèrent significativement, il est nécessaire d'atteindre une plus grande précision. Pour cela, il est indispensable d'obtenir un grand nombre de points avec les solutions à tester pour les comparer entre elles.

On sait qu'en répétant les déterminations, la précision croît comme la racine carrée du nombre de celles-ci ; si l'on effectue 9 mesures, la précision est trois fois plus grande que si l'on effectue une seule mesure. Réduire les erreurs fortuites est une question de patience dans les limites d'exigence du test. Beaucoup plus graves sont les causes d'imprécision systématiques : celles-ci proviennent, pour une grande part, de la préparation de l'extrait.

F.- PREPARATION DES EXTRAITS

QUELQUES REMARQUES

Nous avons réservé ici l'étude de la préparation des extraits car celle-ci est conditionnée par les exigences du test : cette préparation a essentiellement pour but la destruction des substances susceptibles d'agir sur le test et de réaliser des extraits dont la composition saline est voisine de celle du Tyrode.

DESTRUCTION DES SUBSTANCES GENANTES

Des extraits de sang simplement déféqués à l'acide trichloracétique à 10 pour 100 essayés sur le test d'iléon de Cobaye provoquent une contraction lente qui n'est pas due à l'histamine. La substance inconnue responsable est détruite par ébullition en milieu alcalin. Dans la méthode de BARSOUM et GADDUM (1935), modifiée par CODE (1937), l'ébullition chlorhydrique est utilisée ; elle détruit l'adénosine qui aurait une activité inhibitrice sur le test qui s'opposerait à l'action de l'histamine. La technique primitive de ces auteurs prévoyait les opérations suivantes : défécation par l'acide trichloracétique, puis adjonction d'acide chlorhydrique. On procède alors à une ébullition pendant 1 h.1/2. L'extrait est ensuite soumis à l'évaporation et repris par l'alcool pour chasser l'acide chlorhydrique puis traité plusieurs fois avec de l'alcool saturé de chlorure de sodium.

Dans cette technique, l'élimination des sels minéraux grâce aux extractions par l'alcool saturé de Cl Na permettait d'opérer sur un volume final moindre ; l'extrait correspondant à 10 cm³ de sang complètement desséché est repris par 2 cm³ d'eau. Il fallait donc, non seulement neutraliser mais assurer l'isotonie par une solution de Cl Na, N. Or, CODE C.F. (1937) a beaucoup simplifié cette méthode supprimant :

- 1°- Le traitement à l'éther pour chasser l'acide trichloracétique. Celui-ci est, en effet, éliminé par l'ébullition.
- 2°- L'élimination des sels minéraux. On reprend par l'eau distillée, on neutralise et on arrive à un volume final identique au volume initial. Les sels sont restés ce qu'ils étaient dans le sérum sanguin, la légère hypertonie due à la neutralisation n'est guère gênante.

Nous indiquons ici la technique d'extraction simplifiée d'après CODE et que nous employons :

A.- DANS LE SANG

I.- Préparation de l'extrait.

Première série d'opérations :

- a) Défécation : 10 cm^3 de sang + 15 cm^3 d'acide trichloracétique à 10 p.100.

On laisse reposer pendant une heure. On procède au lavage puis au filtrage du précipité 4 fois avec 5 cm^3 d'acide trichloracétique.

2.- Traitement par l'ébullition en milieu acide

Au filtrat, on ajoute 10 cm^3 d'HCl concentré, on fait bouillir pendant 1 h.1/2, on ajoute, au besoin, de l'eau pour éviter que le volume ne se réduise trop et qu'une dessiccation ne se produise sur les parois du ballon, surtout si on utilise le bain de sable (I).

Vers la fin de l'opération, on laisse réduire à moins de 5 cm^3 .

3.- Traitement à l'alcool et dessiccation :

On ajoute 10 cm^3 d'alcool absolu et on laisse évaporer au bain-marie, on recommence plusieurs fois puis on laisse réduire jusqu'à siccité complète.

Ces opérations sont effectuées I à 2 jours avant le dosage. Les extraits deséchés peuvent être conservés quelques jours et on ne passera aux temps suivants que lorsqu'on sera en mesure d'effectuer les essais sur un test iléon de Cobaye.

Deuxième série d'opérations :

- a.- On reprend le résidu sec avec 2 cm^3 d'eau, on recommence 2 fois, puis on filtre les 6 cm^3 .

- b.- Il faut ensuite neutraliser le résidu avec NaOH N/5 (1 à $1,5\text{ cm}^3$) en vérifiant soigneusement le pH

(bleu de bromothymol, puis bleu de thymol).

c.- Enfin, on complète à 10 cm^3 avec de l'eau.
On centrifuge et on décante.

L'extrait est alors prêt à être utilisé. Un cm^3 de cet extrait correspond à 1 cm^3 de sang initial.

H.- DOSAGE DE L'HISTAMINE DANS LES ORGANES ET LES TISSUS; QUELQUES REMARQUES

1.- Technique : L'organe est broyé au mortier avec un poids équivalent de sable en présence de 4 cm^3 d'acide trichloracétique à 10 pour cent. On procède à la filtration sur Büchner et au lavage du mortier 4 fois avec 4 cm^3 d'acide trichloracétique à 10 pour 100. On poursuit comme il est indiqué plus haut. Au moment du dosage, on reprend l'extrait sec par 5 cm^3 d'eau alcaline. Cependant, le potassium est certainement très gênant car il est très abondant dans les organes : c'est, en effet, un élément endocellulaire. Il est bien préférable de recourir à la phase terminale de la technique originale de BARSOUM et CADDUM:

après ébullition chlorhydrique, on évapore, comme plus haut, jusqu'à siccité sur un bain-marie d'eau bouillante. On ajoute 2 portions de 10 cm^3 d'alcool à 96° , puis, on évapore pour chasser ClH . On extrait ensuite le résidu 3 fois avec 2 cm^3 d'alcool saturé de Cl Na . L'extrait alcoolique est filtré, puis évaporé jusqu'à siccité et le résidu est repris par 2 cm^3 d'eau. On neutralise avec $x\text{ cm}^3$ de Na OH N_3 . On assure l'isotonie en ajoutant $(0,28-x)\text{ cm}^3$ de Na Cl normal (à 5,8 pour 100) et on complète à $2,5\text{ cm}^3$ le volume total.

2.- La technique de CODE est-elle valable ?

ACKERBLOM avait montré que de l'histidiné en solution, traitée par la méthode de CODE, était décarboxylée en partie en histamine et qu'ainsi, une cause d'erreur pouvait s'introduire dans la préparation des extraits qui contiennent de l'histidine (histidine provenant de l'hémoglobine en particulier). Le fait a été confirmé récemment par SCHMITER-

LÖW. L'histidine exerce d'ailleurs sur le test une action inhibitrice sur les réponses à l'histamine. L'étude a été reprise récemment par HUGUES SALWIN et WOOD (1951). Ces auteurs ont montré, en effet, que la réalité de cette décarboxylation, qu'ils ont bien confirmée, ne peut entraîner, dans les conditions habituelles du dosage, une cause d'erreur par excès puisque le sang (Homme, Chat, Lapin) ne contient que 0,1 à 0,2 milligramme d'histidine pour 10cm³ et que, par ailleurs, 10 milligrammes d'histidine traitée par la méthode de CODE seraient nécessaires pour obtenir une surcharge de 10 µg d'histamine.

La technique de CODE reste ainsi une technique actuellement largement éprouvée ; cependant, l'attention est attirée sur deux points :

- 1.- Lors du dosage de l'histamine dans le sang, on peut s'attendre à un excès possible d'histamine de 10 µg par litre à partir de l'histidine contenue dans le sang ce qui est peu gênant en pratique (10 µg par litre de sang étant à la limite de la méthode biologique de dosage) ceci est même d'autant moins gênant que l'histaminémie est plus élevée. D'autre part, les pertes en histamine, qui peuvent se produire au cours des diverses manipulations, sont souvent de cet ordre de grandeur.
- 2.- Le potassium présent en assez grande abondance dans les globules sanguins peut être gênant car certains tests sont très sensibles au potassium qui n'est pas éliminé des extraits dans la technique de CODE. Il est très gênant lorsqu'il s'agit d'extraits de tissus ou d'organes ; il faut alors recourir comme nous l'avons indiqué à la dernière phase de la technique primitive de BARSOU et GADDUM.

Signalons enfin des techniques récentes qui utilisent des adsorbants, comme le succinate de coton (Mc INTIRE, ROTH et SHAW, 1947), qui permettent un isolement plus poussé ainsi que la possibilité de concentrer, ce qui est fort utile dans le cas du dosage de l'histamine, effectué sur le sérum et le plasma où le taux de l'histamine ne représente qu'une faible partie de l'histamine du sang total.

Enfin, nous pensons que, dans un avenir prochain, d'autres techniques permettront d'isoler la fraction histaminique libre ou, du moins, facilement dissociable des substrats sur lesquels elle se trouve fixée.

DOSAGE DE L'HISTAMINE DANS LE SANG EN CLINIQUE

Afin d'être utile au clinicien qui désire faire pratiquer le dosage de l'histamine, nous indiquons ici comment il convient d'effectuer le prélèvement :

Le sang est prélevé sur un malade de préférence à jeun. Le volume du sang prélevé (5 à 10 cm³ sont nécessaires) est mesuré puis aussitôt reçu directement dans un même volume d'acide trichloracétique à 10 pour 100, en ayant soin de bien agiter pendant cette opération. La défécation ayant lieu aussitôt, il n'y a donc pas lieu de se soucier de la coagulation.

Rappelons que l'histaminémie normale s'étend de 0,02 à 0,08 μ g d'histamine base par cm³ de sang (CODE C.F. (1952) (1)). La distribution entre les globules et le plasma est telle que ceux-ci contiennent 10 à 18 fois plus d'histamine que le plasma (Anrep G.V. et Barsdén G.S. cités par CODE, 1952). Habituellement, on pratique le dosage sur le sang total.

VARIATIONS PATHOLOGIQUES DE L'HISTAMINE

Rappelons que les chiffres pathologiques dépassent 100 μ g d'histamine par litre. Dans certaines migraines, la crise d'asthme, on obtient des chiffres relativement modérés (200 à 500 μ g d'histamine base par litre). Les chiffres les plus élevés ont été observés au cours de la poussée d'ulcère gastrique où ceux-ci atteignent et dépassent 1000 μ g par litre.

Il est bon de faire remarquer que, chez beaucoup d'asthmatiques, les taux de l'histamine sont assez souvent relativement peu élevés (200, au plus 400 μ g. par litre comme nous l'avons constaté au cours des récents dosages.

(1) Dans les résultats il est nécessaire de spécifier si l'évaluation est comptée en histamine base ou en histamine dichlorhydrate.

IV .- CONCLUSIONS

La nature complexe de la réponse de l'iléon isolé de Cobaye, telle qu'elle s'est révélée dans un ensemble de recherches, rend nécessaire le recours du diagramme action-dose pour doser biologiquement l'histamine par ce test.

La conduite de l'essai proposé et l'établissement du diagramme action-dose simplifient beaucoup le dosage et permettent la critique des conditions expérimentales en vue de l'application à la clinique.

Sur un plan d'ordre physiopathologique, la dualité fonctionnelle qui s'est manifestée dans les réponses de l'intestin pourra, sans doute, expliquer certaines actions complexes s'exerçant dans les divers syndromes où l'histamine intervient.

VU & PERMIS D'IMPRIMER :

Le RECTEUR de l'ACADEMIE de PARIS :

J. S A R R A I L H

Le DOYEN de la FACULTE
de MEDECINE de PARIS :

Le PRESIDENT de la THESE :

L. B I N E T

R. H A Z A R D

BIBLIOGRAPHIE

- ÅKERBLOM, E. (1951). Zur Histaminbestimmung in Gewobsextracten
Acta Physiol. Scand. 21 378-380
- AMBACHE N. et ROCHA E SILVA M. (1951) - Analysis of certain
interactions of nicotine with bradykinin
and histamine
Brit. J. Phar. 6, 68-74
- ANDRAL, A.M., BLAIZOT, J. et BLAIZOT S. (1951)
Action de l'aneurine sur l'intestin
isolé du Rat et de la Souris. Son in-
fluence sur la réponse de cet organe à
l'Acétylcholine.
Arch. Sci. Physiol. (C.N.R.S.) 5, 323-334
- BACQ, Z.M. (1939) Ions et Corps Vénératriniques
Arch. Int. Pharmacodyn. 63, 59-87
- BACQ, Z.M. (1942) Le Sulfocyanure, l'Hyposulfite et la
Colchicine oxydée, Substance vénératriniques
Arch. Int. Pharmacodyn. 67, N° 3 23-333
- BACQ, Z.M. (1947) Les sensibilisateurs au Potassium
Bull. Ac. Royale Belgique, 6ème Série,
12, 255-275
- BACQ, Z.M. (1951) Nouveaux sensibilisateurs du muscle strié
aux ions K,
Acta Biol. Belgica, 1, p. 169
- BARSOUM, G.S. et GADDUM J.H. (1935)
The Pharmacological estimation of adono-
sine and Histamine in Blood
J. Physiol. LONDON, 85, 1 - 14

BERTRAND I., GAYET-HALLION, TH., QUIVY, D., (1951)

Existence de groupements fonctionnels de
musculature de l'intestin révélée par
l'analyse de variance.

C.R. Ac. Sciences. PARIS, 232, 1157

BLISS, C.I. (1934) The method of probits

Science, 74, 38-39 et 408-409

BLISS C.I. et MARKS, H.P., (1939)

The biological assay of insulin. Some
general considerations directed to
increasing the fraction of the precision
of the curve relating dosage and graded
response.

Quart. J. Pharm., 12, 82-110

BLISS, C.I. et Mc KATTELL K., (1943)

Biological Assay

Ann. Rev. Physiol., 5, 479-539

BONSIGNORE A.E. et MORANDO G.C., (1940)

Relazioni tra dose e risposta dell'acetil-
colina e dell'istamina sull'intestino
isolato, applicazioni al dosaggio quan-
titativo dell'istamina.

Ormoni, 2, 263-272

BOZLER, E. (1927)

Über die Tätigkeit der einzelnen glatten
Muskeifasern bei der Kontraktion =

Z. Verh. Physiol., 6, 361-377

BOZLER, E. (1936)

Analysis of the properties of smooth
muscle

Cold. Spr. Harb. Symposia, 4, 260-266

BURN, J.H., FINNEY, D.J. et GOODWIN, L.G., (1950)

Biological Standardization

Oxford University Press (LONDON)

BURN, J.H. et AL., (1950)

A discussion on the action of local hormones
Proceedings of the Royal Society,

B, 137, 281-320.

CANTONI, G.L. et EASTMANN, G. (1946)

Response of the intestine to smooth-muscle
stimulants

J. Pharmacol., 87, 392-399

CAPRETTI, G. et GUARNIERI, R. (1948)

La Sparteina possiede una azione anti istami-
nica.

Arch. Farmac. Sper. Sci. affini, 77, 143-158

CHEN, G., ENSOR, C.R. et CLARKE, I.G. (1948)

The biological assay of histamine and diphen-
hydramine hydrochloride (Benadryl).

J. Pharm., 92, 90-97

CLARK, A.J. (1933)

The mode of action of drugs on cells

ARNOLD & Co, LONDON

CODE, C.F. (1937) The quantitative estimation of histamine
in the blood.

J. Physiol. LONDON, 89, 257-268

CODE, C.F. (1952) - Histamine in blood

Physiol. Rev., 32, 47-63

EMMELIN, N. et FELDBERG, W. (1947)

The smooth muscle contracting effects of various
substances supposed to act on nervous structures
in the intestinal wall

J. Physiol. LONDON, 106, 482-502

FELDBERG W. & LIN R.C.Y. (1949)

The action of local anaesthetics and d Tubocurarine on the
isolated intestine of the Rabbit and Guinea-Pig

Brit. Pharm. Chemoth., 4, 33-44

FELDBERG, W. (1951) Effects of ganglion-blocking substances
on the small intestine.

J. PHYSIOL. LONDON, 113, 483-505

FINNEY D.J. Probit Analysis
Oxford U. Press, LONDON.

FLETCHER, C.M. (1937) The relation between the mechanical
and electrical activity of a molluscan
unstirred muscle.
J. Physiol. LONDON, 91, 172-185

GADDUM, J.H. (1933)
Reports on Biological Standards,
III. Methods of Biological assay depending on
a Quantal response.
Special Report 183, Med. Research Council,
LONDON, His Majesty's Stationery Office
46 pp.

GADDUM, J.H. (1948) Histamine
Brit. Med. J. 8 M&I, 867-873

GODEAUX, J. (1942)
Muscles lisses et sensibilisants aux ions
Arch. Int. Pharmacodyn. 67 - 425

GUGGENHEIM, M. & LOFFLER, W. (1916)
Biologischer Nachweis proteinogener Amine
in Organextracten und Körperflüssigkeiten
Biochem Z. 72, 303-324

HENRY, S. (1894) - Probabilité du Tir, FONTAINEBLEAU.

HUGHES, D.E., SALVIN, E. et WOOD, D.R. (1951)
Decarboxylation of histidine as a source
of error in extracting histamine from
tissues.
J. PHYSIOL. LONDON, 113, 218-227

KWIATKOWSKI, H. (1941)
Observations on the relation of histamine
to reactive hyperaemia
J. Physiol. LONDON, 100, 147-158

LANGE, F.; FELIX, K. et PUTZER-REYBEGG, A.V. (1930)

(Cité d'après UNGAR (1937))

Les substances histaminiques et la transmission chimique
de l'influx nerveux, L'histaminergie normale et pathologique

PARIS, HERMANN & Co. 1 vol. 89 p.

LECOMTE J. (1950), Calcium et antihistaminiques dans
les réactions allergiques avec oedèmes.
Arch. Int. Pharmacodyn. 83, 288-295

LECOMTE, J. (1950) Antihistaminiques de synthèse et ions
potassium.
Arch. Int. Pharmacodyn., 83, 360.

Mc INTIRE F.C., ROTH, L.W. et SHAW, J.L. (1947)

The purification of histamine for bioassay.
J. Biol. Chem., 170, 537-544

MONGAR, J.L. et SHILD, H.O. (1951) Potentiation of the
Action of Histamine by semicarbazide -
Nature, LONDON, 167, 232

PARROT, J.L. Action de l'Histamine sur l'iléon isolé
de cobaye; Analyse du diagramme action-dose
J. Physiol. PARIS, 42, 697-699

PARROT, J.L. et GABE, M. (1945) Sur la répartition
de l'histamine dans les éléments constitutifs
du sang humain
C.R. Soc. Biol. PARIS, 139, 965

PARROT, J.L., THOUVENOT, J. et LONGUEVALLES (1952)
Libération de potassium par l'histamine
Etude sur le jejuno-iléon isolé du cobaye
C.R. Soc. Biol. PARIS, 146, 359.

PARROT, J.L. et THOUVENOT, J. Action de l'histamine
sur l'iléon isolé du cobaye. Double réaction
des fibres longitudinales
Schw. Med. Wschr. 82, 1014-1018.

QUIVY, D. et BERTRAND, J. (1948) -

Dosage biologique des agents contracturants du muscle lisse : lobe postérieur d'hypophyse et histamine - Traitement des données expérimentales.

Arch. Int. Pharmacodyn. 75, N° 3 & 4, 353-361

QUIVY, D. et BERTRAND J. (1948) -

Le dosage des spasmolytiques sur le muscle lisse, d'après les méthodes récentes

Ann. Pharmac. Franc. 6, 577-582

SCHILD, H.O. (1942) Method of conducting a biological assay on a preparation giving repeated graded responses illustrated by the estimation of histamine

J. Physiol. LONDON, 101, 115-130

SCHILD, H.C. (1944) An approximately linear and isotonic frontal writing lever.

J. Physiol. LONDON, 103, 11 p.

SCHILD, H.O. (1946) Automatic apparatus for pharmacological assays on isolated preparations.

Brit. J. Pharmacol. 1, 135-138.

SCHILD, H.O. (1947) - pA, A new scale for the measurement of drug antagonism.

Brit. J. Pharmac. Chemoth., 2, N°3, 189-206.

SCHMITERLOW, C.G. (1949) Some remarks on the determination of histamine with special reference to horse blood,

Acta Physiol. Scand. 19, 260-269.

TREVAN, J.W. et BOOK, E.M. (1928) The pharmacological assay of digitals, by different methods
Quart. J. Pharm., 1, ?

UNGAR, G., PARROT, J.L. et BOVET, D. (1937)

Inhibition des effets de l'histamine sur l'intestin isolé de cobaye par quelques substances sympathicomimétiques et sympathicolytiques
C.R. Soc. Biol. PARIS, 124, 445.

UNGAR. G. et PARROT. J.L. (1937)

Mise en évidence in vitro de la libération de substances histaminiques dans le choc anaphylactique.

Ann. Physiol., 13, 939-942.

YU-CHUN HSU. U. (1948) - The influence of the magnesium concentration in the Ringers solution used for the assay of oxytocin in pituitary extracts
Quart. J. Pharmacol. 21, 146-151

ZEDINA, R. (1947)

Quelques facteurs modifiant la concentration histaminique de l'intestin isolé.

XV^e Réunion Ass. Physiol. Langue Française,
TOULOUSE, 215-218.
